



CAMILA CARLOS

**Caracterização taxonômica e funcional da comunidade bacteriana
associada a corais do Estado de São Paulo**

**Taxonomic and functional characterization of bacterial communities
associated to corals of the São Paulo State coast**

CAMPINAS
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



CAMILA CARLOS

Caracterização taxonômica e funcional da comunidade bacteriana associada a corais do Estado de São Paulo

Taxonomic and functional characterization of bacterial communities associated to corals of the São Paulo State coast

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
CAMILA CARLOS
e aprovada pela Comissão Julgadora.

*Tese apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do
Título de Doutor em Genética e
Biologia Molecular, na área de
Genética de Microrganismos.*


Orientadora: Prof^a Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni

CAMPINAS, 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C195c Carlos, Camila, 1986-
Caracterização taxonômica e funcional da comunidade bacteriana associada a corais do Estado de São Paulo / Camila Carlos. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Laura Maria Mariscal Ottoboni.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ecologia microbiana. 2. Metagenoma. 3. Genoma. 4. Corais. 5. Comunidades bacterianas. I. Ottoboni, Laura Maria Mariscal. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Taxonomic and functional characterization of bacterial communities associated to corals of the São Paulo State coast

Palavras-chave em inglês:

Microbial ecology

Metagenome

Genome

Coral

Bacterial communities

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Laura Maria Mariscal Ottoboni [Orientador]

Valéria Maia Merzel

Fabiana Fantinatti Garboggini

Lúcio Fábio Caldas Ferraz

Suzan Pantaroto de Vasconcellos

Data de defesa: 07-04-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 7 de abril de 2014

BANCA EXAMINADORA


Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni (orientadora)


Assinatura

Dra. Valéria Maia Merzel


Assinatura


Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini


Assinatura

Prof. Dr. Lucio Fábio Caldas Ferraz


Assinatura

Profa. Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos


Assinatura

Dra. Suzete Aparecida Lanza Destefano

Assinatura

Dr. Renato Vicentini Dos Santos

Assinatura

Dra. Luciana De Campos Paulino

Assinatura

ABSTRACT

Coral reefs are one of the ecosystems most threatened by global climate changes. Studies have shown the importance of the coral microbiota in stress and disease resistance. In this work, the taxonomic and functional characterization of the bacterial communities associated with corals from the coast of São Paulo State, Brazil, allowed the identification of species-specific interactions between corals and bacteria and the identification of the bacterial functions responsible for the establishment of these interactions. The taxonomic composition of mucus, water and surrounding sediment of four coral species (*Tubastraea coccinea*, *Madracis decactis*, *Mussismilia hispida* and *Palythoa caribaeorum*) found in the coast of Sao Paulo State was assessed by 16S rDNA pyrosequencing of metagenomic DNA. The microbial communities found in samples of mucus, water, and sediment differed according to the taxonomic composition, and the coral mucus community seemed to be more stable to seasonal changes. The taxonomic composition of the microbiota of the soft coral *Palythoa caribaeorum* was distinct from the other species belonging to the order Scleractinia, indicating the influence of phylogenetic relationships in shaping the microbial communities associated with the coral. The metagenome of *Madracis decactis* and the Brazilian endemic species *Mussismilia hispida* was sequenced by pyrosequencing. Most of the sequences obtained could not be annotated, which might indicate an abundance of unknown microorganisms, especially viruses. Among the annotated sequences, an abundance of viral sequences in both libraries was observed. The metagenomas *M. decactis* and *M. hispida* were compared with metagenomes datasets available in the MG-RAST database and through these comparisons, the most abundant proteins or functions of the corals' metagenomes were identified, for example, genes for resistance to antibiotics of the aminoglycoside class. Finally, the genome of an isolate of mucus of *M. hispida*, *Paracoccus* sp . SM22M - 07 was sequenced. The comparative

analysis of this genome with other genomes of the genus *Paracoccus* revealed unique functions of the bacteria isolated from coral mucus, such as genes of the type IV secretion system, which may contribute to the establishment of coral-bacteria interactions. All results presented and analyzed in this work show a great diversity, both taxonomic and functional, of the bacterial community associated with Brazilian corals. The seasonal stability of these communities is an important property that contributes to preventing the colonization by pathogenic bacteria. The results presented here represent an extensive inventory of microbial diversity in an ecosystem threatened by global climate change and will allow future comparisons, modeling and estimates of the rates of reduction of microbial diversity in marine environments.

RESUMO

Os recifes de corais são ecossistemas sensíveis que estão ameaçados pelas mudanças climáticas. Estudos têm demonstrado a importância da microbiota associada aos corais na resistência às doenças e aos estresses. Neste trabalho, a caracterização taxonômica e funcional da microbiota associada a corais encontrados no litoral de São Paulo permitiu a identificação de associações espécie-específicas entre corais e bactérias e a identificação de funções bacterianas responsáveis pelo estabelecimento de associações coral-bactéria. A composição taxonômica associada a ambientes coralíneos (muco, água e sedimento do entorno) de quatro espécies de corais (*Tubastraea coccinea*, *Madracis decactis*, *Mussismilia hispida* e *Palythoa caribaeorum*) encontradas no litoral de São Paulo foi avaliada por pirosequenciamento do gene de rRNA 16S. Os resultados indicam que a comunidade microbiana do muco não é apenas distinta do ambiente do entorno, todavia é, também, mais estável ao longo das estações do ano. A composição taxonômica da microbiota do coral mole *Palythoa caribaeorum* foi bastante distinta das demais espécies, pertencentes estas à ordem Scleractinia, indicando a influência das relações filogenéticas na moldagem das comunidades microbianas associadas aos corais. O metagenoma de *Madracis decactis* e da espécie brasileira endêmica *Mussismilia hispida* foi sequenciado por pirosequenciamento. A maior parte das sequências obtidas não pôde ser anotada, o que pode indicar a abundância de micro-organismos, especialmente vírus, ainda não estudados. Entre as sequências anotadas, foi observada uma grande abundância de sequências de origem viral em ambas as bibliotecas. Os metagenomas de *M. hispida* e *M. decactis* foram comparados a outros metagenomas disponíveis no banco de dados do MG-RAST e foi possível identificar genes ou funções mais abundantes nessas bibliotecas, como genes de resistência a antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, que podem estar sujeitos à transferência horizontal nesse ambiente. Por último,

foi sequenciado o genoma de uma bactéria isolada de muco de *M. hispida*, *Paracoccus* sp. SM22M-07. A análise comparativa desse genoma com outros genomas do gênero *Paracoccus* revelou funções únicas do isolado de muco de coral, por exemplo, genes do sistema de secreção do tipo IV podem exercer a função de contribuir com o estabelecimento de interações bactéria-coral. Todos os resultados aqui apresentados e analisados apontam para uma grande diversidade tanto taxonômica quanto funcional da comunidade bacteriana associada aos corais brasileiros. A estabilidade sazonal dessas comunidades é uma propriedade importante que contribui para a prevenção da colonização de bactérias patogênicas. Os resultados aqui apresentados representam um extenso inventário da diversidade microbiana em um ecossistema ameaçado pelas mudanças climáticas globais e permitirão futuros estudos comparativos e a criação de modelos e estimativas das taxas de redução da diversidade microbiana em ambientes marinhos.

SUMÁRIO

ABSTRACT	VII
RESUMO	IX
AGRADECIMENTOS.....	IX
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XVII
I. INTRODUÇÃO	1
I.1 RECIFES DE CORAIS E A AMEAÇA DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS.....	2
I.2 CORAIS NO ESTADO DE SÃO PAULO	4
I.3 COMUNIDADES MICROBIANAS ASSOCIADAS AOS CORAIS: CORAL HOLOBIONTE.....	5
I.4 RELAÇÕES CORAL-BACTÉRIA: ESTABELECIMENTO E ESPECIFICIDADE	9
II. OBJETIVOS DO TRABALHO	13
CAPÍTULO 1.....	15
ARTIGO: BACTERIAL COMMUNITIES AND SPECIES-SPECIFIC ASSOCIATIONS WITH THE MUCUS OF BRAZILIAN CORAL SPECIES	15
CAPÍTULO 2.....	25
METAGENOMA DE <i>MUSSISMILIA HISPIDA</i> E <i>MADRACIS DECACTIS</i>: FOCO EM SEQUÊNCIAS VIRAIS	25
2.1 INTRODUÇÃO	26
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
2.4 CONCLUSÃO	50
2.5 REFERÊNCIAS.....	50
CAPÍTULO 3.....	55
ANÁLISE DE GENÔMICA COMPARATIVA COM <i>PARACOCCLUS</i> SP. SM22M-07 ISOLADO DE MUÇO DE CORAL: NOVAS REVELAÇÕES SOBRE AS INTERAÇÕES CORAL-BACTÉRIA	55
3.1 INTRODUÇÃO	56
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
3.4 CONCLUSÃO	78
3.5 REFERÊNCIAS	78
III. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
V. APÊNDICES.....	99
V.1 APÊNDICE I.....	100
V.1 APÊNDICE II	107

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me guiado e me abençoado nessa caminhada.

À minha mãe, pelo seu apoio e amor incondicional e por tudo o que sou hoje.

À minha irmã Beatriz, pelo seu carinho e admiração.

A toda minha família pelo apoio e carinho.

À minha orientadora, Laura Ottoboni, por acreditar em mim e por sua fundamental contribuição para a minha formação, desde a graduação até hoje.

A todos os colegas de laboratório, Rafa, Thiago, Letícia, Daniel e Vivi, por sempre me ajudarem, me ensinarem, e pela amizade.

Aos membros e suplentes da banca, Prof^a Valéria M. de Oliveira, Prof^a Fabiana Fantinatti-Garboggini, Prof. Lúcio F. C. Ferraz, Prof^a Suzan Pantaroto, Prof^a Luciana de Campos Paulino, Prof^a Suzete A. L. Destefano, Prof. Renato Vicentini, pela contribuição dada ao trabalho.

Aos colaboradores deste projeto, Profa. Dra. Tatiana T. Torres, Dra. Fabiana Alexandrino e Prof. Dr. Forest Rowher, pela contribuição dada ao trabalho.

A todos os meus amigos de Campinas e da Universidade, pela paciência e apoio.

Às minhas eternas amigas, Daniele, Camila, Débora e Juliana, por estarem sempre comigo apesar de todas as mudanças pelas quais passamos.

Aos colegas e funcionários do CBMEG e da Secretaria de Pós-Graduação.

Ao CEBIMAR/USP, pelo auxílio nas coletas dos corais.

À FAPESP, pelo apoio financeiro (Número do processo: 2010/02325-6).

Ao CBMEG e à Unicamp, pelo apoio institucional.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para este trabalho.

“O conhecimento nos faz responsáveis.”

Che Guevara

“The molecular cup is now empty. The time has come to replace the purely reductionist “eyes-down” molecular perspective with a new and genuinely holistic, “eyes-up,” view of the living world, one whose primary focus is on evolution, emergence, and biology’s innate complexity.”

Carl Woese

"More grass means less forest; more forest less grass. But either-or is a construction more deeply woven into our culture than into nature, where even antagonists depend on one another and the liveliest places are the edges, the in-betweens or both-ands. (...)

Relations are what matter most.”

Michael Pollan

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

COG = *Clusters of Orthologous Groups*

DNA = ácido desoxirribonucleico

dNTP = Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

dsDNA = DNA dupla fita

GTA = agente de transferência de genes

Kb = kilobases

L = litros

Mb = megabases

MDA = *Multiple displacement amplification*

min = minuto

mM = milimolar

ORF = *Open Reading Frame*

OTU = *Operational Taxonomic Unit*

pb = pares de bases

PCR = reação de polimerase em cadeia

peg = *protein encoding gene*

rDNA = DNA ribossomal

ssDNA = DNA simples fita

T2SS = Sistema de secreção tipo II

T4SS = Sistema de secreção tipo IV

Taq = Taq DNA polimerase

THG = Transferência horizontal de genes

UV = Ultra-violeta

µg = microgramas

µL = microlitros

µM = micromolar

I. INTRODUÇÃO

I.1 Recifes de corais e a ameaça das mudanças climáticas

Os recifes de corais formam o mais produtivo e diverso dos ecossistemas marinhos. Estima-se que, apesar de ocuparem apenas 0,2% dos oceanos em todo mundo, os recifes possuam 25% de toda a diversidade marinha (Davidson, 1998). Além disso, são essenciais para milhões de pessoas que vivem deles. Contudo, apesar de sua importância, muitos recifes de corais têm diminuído nas últimas décadas devido a muitos estresses locais, como poluição, superexploração, turismo desgovernado, entre outros fatores.

As mudanças climáticas também oferecem perigo à saúde dos recifes de corais e podem devastá-los por todo o mundo (Wilkinson, 2008). O IPCC (Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas) listou em 2007 seis consequências das mudanças climáticas como os principais fatores que afetam atualmente, ou podem vir a afetar, os recifes de corais em todo o mundo, são elas: a elevação da temperatura da superfície do mar, o aumento do nível deste, bem como das concentrações de CO₂ na água do mar, o aumento da incidência de raios UV e de tempestades, furacões e ciclones e, finalmente, as mudanças nas correntes marinhas. A elevação da temperatura e da concentração de CO₂ são as principais ameaças aos corais. O aumento da temperatura da superfície da água é um fator estressante a estes, o qual, frequentemente, leva ao branqueamento dos corais. Quando tal acontecimento se dá em larga escala, pode levá-los à morte. Estresses severos geralmente resultam na morte de corais, pois reduzem sua habilidade de reprodução e aumentam a suscetibilidade a infecções. O aumento das concentrações de CO₂ diminui o pH da água do mar, fenômeno conhecido como acidificação oceânica, que tem como consequência a diminuição da concentração de íons carbonatos. Tal fenômeno reduz a capacidade dos corais e de outros organismos calcificadores de produzirem o esqueleto calcário. A acidificação

oceânica também pode aumentar a suscetibilidade ao branqueamento e a outras doenças (Wilkinson, 2008).

Estima-se que, nos últimos 30 anos, houve uma redução de 30% dos corais em todo o mundo, devido, principalmente, a doenças emergentes. Existem mais de vinte doenças de corais descritas. Entretanto, apenas seis tiveram seus agentes isolados e caracterizados (Tabela I.1). Em escala global, o branqueamento é a doença que mais ameaça os corais. Ele consiste na perda da zooxantela, tornando os tecidos do coral transparentes, deixando o branco do esqueleto calcário visível. Outros sinais do branqueamento são: (1) afinamento dos tecidos do coral, (2) redução do muco e (3) inibição da reprodução sexual. O branqueamento é reversível já que, em muitos casos, há o retorno das zooxantelas. Entretanto, o coral morre se o branqueamento persistir por muito tempo. Geralmente, a incidência de tal doença coincide com o período mais quente do ano e, nos casos mais graves, com períodos anormais de calor (Rosenberg *et al.*, 2007a).

Tabela I.1. Patógenos de corais (adaptado de Rosenberg *et al.*, 2007a)

Doença	Coral	Patógeno
Branqueamento	<i>Oculina patagonica</i>	<i>Vibrio shiloi</i>
Branqueamento e lise	<i>Acropora palmata</i>	<i>Vibrio coralliilyticus</i>
Aspergilose	Gorgônias	<i>Aspergillus sidowii</i>
Banda branca	<i>Acropora</i> sp.	<i>Vibrio carchariae</i>
Praga branca	Vários	<i>Aurantimonas coralicida</i>
Praga branca (Eliat)	Vários	<i>Thalassomonas loyana</i>
Varíola Branca	<i>Acropora palmata</i>	<i>Serratia marcescens</i>
Mancha amarela	<i>Monastraea</i> sp	<i>Vibrio alginolyticus</i>
Banda negra	Vários	Consórcio

Segundo a Organização Meteorológica Mundial, a década de 2000-2009 foi considerada a mais quente (desde que medições confiáveis começaram a ser feitas, por volta de 1850) e a tendência é a temperatura aumentar cada vez mais (WMO, 2009). Tal fator ameaça a saúde dos corais por todo o mundo. Sendo assim, os pesquisadores vêm juntando esforços para monitorar e proteger esses ecossistemas. A *National Oceanic and Atmospheric Administration*, dos Estados

Unidos da América (EUA), criou um sistema de monitoramento por satélites da temperatura da superfície do mar. Tal sistema permite a identificação de *hotspots* de branqueamento dos corais (<http://www.osdpd.noaa.gov/ml/ocean/cb/hotspots.html>). Segundo esse sistema, alterações na temperatura da superfície do mar em 2°C alertam para possíveis *hotspots* (Liu *et al.*, 2004).

Apesar de não terem sido apontados muitos *hotspots* no litoral brasileiro, o fenômeno do branqueamento foi registrado no verão de 1994, em São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia e Pernambuco, e observado, novamente, no início de 1996, em São Sebastião – S.P., afetando, principalmente, o coral-cérebro *Mussismilia hispida* e o zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Migotto, 1997).

I.2 Corais no Estado de São Paulo

Corais escleractíneos são compostos de um ou mais pólipos formados por uma camada externa, o ectoderma, por uma camada interna gastrodermal e, dentre elas, há uma camada acelular chamada mesoglea. No ectoderma, se forma o esqueleto calcário, que suporta os tecidos do coral e, por isso, são chamados de corais pétreos. Os corais escleractíneos, que apresentam associação com algas endossimbiontes chamadas de zooxantelas, são os principais representantes dos corais hermatípicos, ou seja, dos corais formadores de recifes. Esses corais prosperam em águas tropicais claras e pobres em nutrientes (Collins, 2002; Brusca & Brusca, 2003; Ruppert, Fox & Barnes, 2004).

Os ambientes costeiros da América do Sul são caracterizados pela forte influência de grandes rios, como o rio Amazonas, que introduzem grandes quantidades de sedimentos, os quais inibem o desenvolvimento de recifes de corais extensos. Esse fenômeno é chamado de barreira amazônica e parece impedir que muitas espécies de coral se dispersem através dela. Na costa do

Brasil existem muitas espécies de corais que não são encontradas no Caribe e vice-versa (Haemig, 2008). Além disso, o grande volume de precipitação aumenta a turbidez e a sedimentação da água. No Brasil, os recifes de corais ocorrem principalmente na costa do Nordeste, sendo Abrolhos, na Bahia, o maior banco de recifes do Brasil. A diversidade de corais hermatípicos é relativamente baixa, apenas 18 espécies de corais. Entretanto, oito delas são endêmicas (Wilkinson, 2008).

Apenas duas espécies de corais hermatípicos ocorrem no litoral do Estado de São Paulo, são elas *Mussismilia hispida* e *Madracis decactis* (Migotto *et al.*, 1999). Ambas são encontradas apenas sob a forma de colônias isoladas, isto é, não formam estruturais recifais. *M. hispida* é uma espécie endêmica do Brasil que ocorre entre os litorais da Bahia e de São Paulo. *M. decatis* ocorre no Atlântico do litoral dos EUA até o Brasil. Apesar de não formarem recifes, essas espécies são importantes no litoral do Estado de São Paulo, pois sustentam toda uma comunidade de fauna bentônica (Nogueira, 2003).

Várias espécies de corais não hermatípicos são encontradas no litoral de São Paulo, como o zoantídeo colonial *Palythoa caribaeorum*, os quais são conhecidos como corais moles, pois não apresentam esqueleto calcário. Também são encontradas nessa mesma localidade espécies de corais invasores, com as do gênero *Tubastraea* sp., as quais estão ameaçando os corais endêmicos.

I.3 Comunidades microbianas associadas aos corais: Coral Holobionte

Os corais formam um complexo sistema holobionte (hospedeiro e todos os micro-organismos associados) com micro-organismos representantes dos três domínios (Bactéria, Archaea e Eucarya) e também vírus.

A associação endossimbiótica mais importante ocorre entre o coral e as algas dinoflageladas do gênero *Symbiodinium*, conhecidas como zooxantelas. Essas algas conferem cor ao coral, realizam fotossíntese e disponibilizam aos corais fontes de carbono. Elas ainda, produzem

grandes quantidades do oxigênio utilizado na respiração do coral e dos micro-organismos associados. Os corais, por sua vez, produzem gás carbônico, compostos nitrogenados e fósforo, que são utilizados pelas algas (Fallowski *et al.*, 1984).

Os corais fornecem três habitats distintos para micro-organismos: o muco superficial, seus tecidos e o esqueleto calcário, sendo que cada um apresenta uma população microbiana distinta (Bourne & Munn, 2005; Koren & Rosenberg, 2006). Os primeiros estudos de microbiologia de corais se concentraram na microbiota associada ao muco, utilizando métodos dependentes de cultura, e foi encontrada uma grande diversidade bacteriana (Ducklow & Mitchell, 1979; Ritchie & Smith, 1997).

A partir de 2001 começaram a aparecer os primeiros trabalhos utilizando métodos independentes de cultura (Rosenberg *et al.*, 2007a). De tais trabalhos emergiram algumas generalizações: (1) existe uma grande diversidade de bactérias associadas a um coral, inclusive de novas espécies, (2) a comunidade de bactérias do coral é diferente daquela encontrada na água do mar, sugerindo uma associação específica, (3) a população de bactérias identificadas por métodos dependentes de cultivo é muito distinta da identificada por métodos independentes de cultivo, (4) comunidades semelhantes são encontradas em corais da mesma espécie separados geograficamente, enquanto que diferentes comunidades são encontradas em espécies de corais diferentes e (5) diferentes populações são encontradas nos três habitats (muco, tecido e esqueleto) diferentes de um coral (Rosenberg *et al.*, 2007a).

Reis *et al.* (2008) fizeram a primeira caracterização da microbiota associada a um coral brasileiro, o *Mussismilia brazilienses*. Os autores construíram bibliotecas de rDNA 16S de bactérias do muco e da água do entorno e identificaram, aproximadamente, 170 espécies de bactérias em cada um dos ambientes, entretanto, a curva de rarefação não atingiu o platô, o que

indica uma grande diversidade bacteriana. Esses autores concluíram que a microbiota parece ser espécie específica.

Existem muitas hipóteses sobre a importância da microbiota associada aos corais. Shnit-Orland & Kushmaro (2009) encontraram no muco de seis espécies de corais pétreos e duas espécies de corais moles a presença de micro-organismos com atividade anti-microbiana, sugerindo que essa microbiota possa atuar como a primeira linha de defesa dos corais contra patógenos.

Thurber *et al.* (2009) analisaram a comunidade microbiana de *Porites compressa* sob estresse de alta temperatura, baixo pH, grande quantidade de nutrientes e carbono orgânico dissolvido. Os autores propuseram um modelo de alterações no sistema holobionte sob condições de estresse. Em condições ideais, há a predominância de relações mutualísticas e comensais, porém, durante o estresse, há uma perturbação dessas relações e a microbiota muda de benigna e/ou benéfica para estresse-resistente e potencialmente patogênica e oportunista.

Reshef *et al.* (2006) propuseram a hipótese probiótica. Essa hipótese postula que existe uma relação dinâmica entre micro-organismos simbiotes e as condições ambientais que levam à seleção do holobionte mais vantajoso ao coral. A alteração da composição da microbiota do coral permite uma adaptação mais rápida às mudanças das condições ambientais (dias a semanas) do que a mutação e a seleção (muitos anos). Essa hipótese se baseia nos seguintes fatos: (1) os corais possuem uma grande e diversificada população de bactérias associada ao muco e tecidos, (2) a população bacteriana associada ao coral sofre mudanças rápidas quando as condições ambientais são alteradas e (3) apesar de não apresentarem um sistema imune adaptativo, os corais podem desenvolver resistência a patógenos. Leggat *et al.* (2007) rejeitam essa teoria, acreditando ser ela “micro-cêntrica” e baseada em poucas espécies de corais e em poucos casos de branqueamento.

Além das relações simbióticas, muitos micro-organismos causam doenças nos corais (Tabela I.1). Bactérias do gênero *Vibrio* vêm sendo identificadas como possíveis agentes

causadores do branqueamento. Em 1995, *Vibrio shiloi* foi apontado como o agente causador do branqueamento de *Oculina patagonica* no mediterrâneo (Kushmaro *et al.*, 1996; Kushmaro *et al.*, 1997). O aumento da temperatura foi o principal fator ambiental que levou à doença, pois a infecção e o consequente branqueamento só ocorreram durante o verão, com a temperatura das águas entre 25-30°C e não no inverno (Kushmaro *et al.*, 1998). O poliqueta *Hermodice carunculata*, conhecido como verme-de-fogo, foi identificado como reservatório e vetor de *V. shiloi* (Sussman *et al.*, 2003). *Vibrio coralliilyticus* é o agente do branqueamento do coral *Pocillopora damicornis* no Mar Vermelho e no Oceano Índico, e a infecção também parece estar relacionada com a temperatura da água (Ben-Haim & Rosenberg, 2002; Ben-Haim *et al.*, 2003).

Rosenberg *et al.* (2007b) descrevem o modelo de infecção de *O. patagonica* por *V. shiloi*. No verão, quando as temperaturas sobem, o verme-de-fogo (*Hermodice carunculata*), que é reservatório de *V. shiloi*, se alimenta do coral. A bactéria é quimio-atraída pelo muco do coral *O. patagonica* e penetra através de uma adesina nas células da camada epidermal, onde se multiplica atingindo a densidade de 10^9 células por cm^3 . Neste estágio, *V. shiloi* expressa a toxina P, a qual inibe a fotossíntese da alga intracelular levando à expulsão da alga e à perda da coloração do coral (branqueamento). No inverno, quando as temperaturas caem, o patógeno deixa de produzir a enzima superóxido dismutase, a toxina P e a adesina. *V. shiloi* é então eliminada pelos radicais livres de oxigênio produzidos pelo hospedeiro e *O. patagonica* volta a ganhar as zooxantelas.

O efeito de alterações ambientais sobre a comunidade microbiana associada a corais também vem sendo estudado. Sharp & Ritchie (2012) descreveram um modelo do efeito das mudanças climáticas sobre o sistema holobionte. Nesse modelo, quando há aumento de temperatura na superfície do mar, os compostos anti-microbianos presentes no muco do coral desaparecem e a microbiota, que é normalmente dominada por micro-organismos benéficos, passa a ser predominantemente patogênica. Além disso, acredita-se que o aquecimento global vai aumentar a

dispersão, o crescimento e a persistência de bactérias patogênicas em ambientes aquáticos, como as bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio* (Vezzuli *et al.*, 2013).

I.4 Relações coral-bactéria: estabelecimento e especificidade

Ainda não há um consenso sobre a existência de relações espécie-específicas entre bactérias e corais. Poucos estudos caracterizaram a comunidade bacteriana de corais de uma maneira suficientemente robusta (ou seja, a partir de várias amostragens de diversas espécies de corais, comparando-as ao ambiente do entorno e utilizando um sequenciamento profundo o suficiente para encontrar membros raros) para que se possa inferir a existência de tal tipo de relação.

Recentemente, Lema *et al.* (2012) avaliaram a diversidade do gene *nifH*, que codifica uma dinitrogenase bacteriana, nos tecidos e no muco de três espécies de corais da grande barreira de corais da Austrália e os compararam à água do entorno. As sequências encontradas no muco apresentaram grande diversidade e não apresentaram associações específicas nem com as espécies de corais nem com o local de coleta. Os autores sugeriram que tal resultado deveu-se à natureza efêmera do muco. Entretanto, nos tecidos dos corais foram encontradas sequências aparentemente espécie-específicas. Reis *et al.* (2009) e de Castro *et al.* (2010) sugerem a existência de associações espécie-específicas no muco de *Mussismilia braziliensis* e *Mussismilia hispida*, mas em nenhum desses trabalhos foi feita a comparação às comunidades do sedimento ou de outras espécies de corais. Ceh *et al.* (2011) analisaram a comunidade microbiana associada ao tecido de três espécies de corais e compararam à água e ao sedimento do entorno, utilizando bibliotecas de clones de rDNA 16S. Nesse trabalho não encontraram associações espécie-específicas. Já Neulinger *et al.* (2008) e Kellogg *et al.* (2009) têm sugerido a existência de uma comunidade bacteriana comum a

todos os membros da Ordem Scleractinia, ao invés da existência de associações bactéria-coral específicas para cada espécie de coral.

A maneira como as associações bactéria-coral são estabelecidas também é um dos principais interesses dos estudos de microbiologia de corais. Evidências apontam que a colonização dos tecidos dos corais por bactérias presentes na água do mar ocorra após o assentamento das larvas de vida livre nadante (Sharp *et al.*, 2010). Sweet *et al.* (2011) demonstraram que as bactérias associadas às superfícies de corais são selecionadas a partir de populações bacterianas pouco abundantes na água do mar ou a partir da transmissão direta por contato, por exemplo, com partículas de sedimento. Essas bactérias crescem rapidamente na superfície dos corais devido à grande disponibilidade de nutrientes e se tornam abundantes. Acredita-se que a formação de comunidades microbianas epibióticas associadas a macro-organismos marinhos, a partir dos micro-organismos presentes na coluna d'água, seja um processo parcialmente seletivo e parcialmente aleatório, ou seja, alguns dos micro-organismos encontram-se em associação meramente devido ao acaso, mas outros são selecionados por conseguirem explorar os nichos existentes (Burke *et al.*, 2011b). Por exemplo, no caso dos corais, o muco, uma camada de glicoproteínas sulfatadas que reveste toda a superfície dos corais, é rico principalmente em açúcares, como a fucose (Wild *et al.*, 2010), e proteínas, como a mucina (Jatkar *et al.*, 2010), o que difere em composição e abundância de recursos da água do mar ou do sedimento marinho. Assim sendo, pode-se esperar que os micro-organismos que ali vivem devam ser aptos a explorar esse nicho rico em nutrientes. Além disso, acredita-se que substâncias inibidoras de crescimento e/ou adesão bacteriana produzidas tanto pelo coral quanto pela sua microbiota podem ser responsáveis pela seleção das bactérias marinhas aptas a colonizar os tecidos dos corais (Sweet *et al.*, 2011; Kvennefors *et al.*, 2012).

Já é bem conhecido que as comunidades microbianas associadas aos corais diferem das comunidades dos ambientes do entorno (Schöttner *et al.*, 2009; 2012), mas existem poucos

trabalhos que exploram e identificam as funções requeridas no estabelecimento e na manutenção das associações coral-bactéria (Garcia *et al.*, 2013; Thurber *et al.*, 2009; Wegley *et al.*, 2007).

Todas as informações mencionadas neste trabalho revelam que, apesar da microbiologia de corais ter recebido muita atenção nos últimos anos, algumas questões biológicas ainda requerem maior investigação, são elas: a) existem associações bacterianas espécie-específicas no muco de corais? e b) quais são os fatores ou funções bacterianas requeridas para o estabelecimento das associações coral-bactéria?

II. OBJETIVOS DO TRABALHO

Objetivo geral:

Este trabalho teve como principal objetivo a caracterizar a microbiota associada a corais do litoral do Estado de São Paulo.

Objetivos específicos:

- **Capítulo 1:** Investigar a existência de associações espécie-específica entre bactérias e espécies de corais encontradas no litoral do Estado de São Paulo, a partir de uma abordagem independente de cultivo.

- **Capítulo 2:** Identificar funções bacterianas responsáveis pelo estabelecimento de associações coral-bactéria, a partir da análise de sequências virais.

- **Capítulo 3:** Identificar funções responsáveis pelo estabelecimento da associação entre um representante do gênero *Paracoccus* (Alphaproteobacteria) e o coral endêmico brasileiro *Mussismilia hispida*, a partir do sequenciamento do genoma da bactéria.

CAPÍTULO 1

***Artigo:* Bacterial communities and species-specific
associations with the mucus of Brazilian coral species**



SUBJECT AREAS:
ENVIRONMENTAL
MICROBIOLOGY
MICROBIAL ECOLOGY
COMMUNITIES
MICROBIOME

Received
27 September 2012

Accepted
14 March 2013

Published
9 April 2013

Correspondence and
requests for materials
should be addressed to
L.M.M.O. (ottoboni@
unicamp.br)

Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species

Camila Carlos¹, Tatiana T. Torres² & Laura M. M. Ottoboni¹

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Rua Candido Rondon 400 - Laboratório de Biologia Molecular e Ambiental, Cidade Universitária, CP 6010, CEP 13083-875, Campinas, SP, Brazil, ²Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 277, Cidade Universitária, CEP 05508-090, São Paulo, SP, Brazil.

We investigated the existence of species-specific associations between Brazilian coral species and bacteria. Pyrosequencing of the V3 region of the 16S rDNA was used to analyze the taxonomic composition of bacterial communities associated with the mucus of four coral species (*Madracis decactis*, *Mussismilia hispida*, *Palythoa caribaeorum*, and *Tubastraea coccinea*) in two seasons (winter and summer), which were compared with the surrounding water and sediment. The microbial communities found in samples of mucus, water, and sediment differed according to the composition and relative frequency of OTUs. The coral mucus community seemed to be more stable and resistant to seasonal variations, compared to the water and sediment communities. There was no influence of geographic location on the composition of the communities. The sediment community was extremely diverse and might act as a "seed bank" for the entire environment. Species-specific OTUs were found in *P. caribaeorum*, *T. coccinea*, and *M. hispida*.

The association between microorganisms and reef-building corals, also called the coral holobiont, has been studied due to its influence on coral physiology and health. The microorganisms associated with corals can play a role in the host's health by providing a food source¹, protecting the host against pathogenic bacteria by the production of antibacterial compounds, and occupying specific niches²⁻⁴. Studies have shown that environmental changes, such as a decrease in pH or a rise in temperature and organic matter, can impact the composition of the coral holobiont⁵⁻⁷. Based on these observations, Reshef *et al.*⁸ suggested the probiotic hypothesis: changes in microbial communities under different environmental conditions allow a rapid and versatile adaptation of the coral holobiont.

Despite the importance of microbial communities to coral health, there are few studies that have focused on the discovering of species-specific associations between corals and bacteria. Species-specific bacterial associations have been found in other animals, such as sponges, hydra, and colonial hydroids⁹⁻¹¹, but the existence of these associations in corals is still controversial. Rohwer *et al.*¹² found a ribotype of the Gammaproteobacteria group, closely associated to the coral *Porites astreoides*. Reis *et al.*¹³ and de Castro *et al.*¹⁴ suggested bacterial species-specific associations in the mucus of *Mussismilia braziliensis* and *Mussismilia hispida*. However, neither of these studies used the microbiota of sediment or of other coral species to confirm the possibility. Kvennefors *et al.*¹⁵ found species- and site-specific associations in the bacterial communities of two coral species from the Australian Great Barrier Reef. Ceh *et al.*¹⁶ analyzed the microbial communities associated with the tissues of three coral species, and compared them with the surrounding water and sediment, finding no species-specific associations. Lema *et al.*¹⁷ assessed the diversity of the *nifH* gene, which encodes a bacterial dinitrogenase, in the tissue and mucus of three coral species from the Australian Great Barrier Reef. The sequences found in the mucus showed a great diversity, and no specific associations with either coral species or sampling site. The authors suggested that this finding was due to the ephemeral nature of the mucus. However, they also found that the dominant *nifH* sequence differed among the tissues of the coral species studied.

The existence of species-specific interactions between bacteria and corals is still uncertain. Few studies have characterized the coral bacterial community composition in a sufficiently statistically robust manner to support it (which means, with replicates, multiple coral species, sampling of the surrounding environment, and a sample size large enough to find rare bacterial species). The aim of this work was to investigate the existence of species-specific associations between Brazilian coral species and bacteria. Pyrosequencing of the V3 region of the 16S



rRNA gene was used to analyze the taxonomic composition of bacterial communities associated with the mucus of four coral species (*Madracis decactis*, *Mussismilia hispida*, *Palythoa caribaeorum*, and *Tubastraea coccinea*) found along the southeast Brazilian coast, during two seasons (winter and summer). The results were compared with the surrounding environment (water and sediment). Our hypothesis is that different coral species harbor distinct mucus microbial communities.

Results

Taxonomic composition and community analyses. A total of 25,035 OTUs were found in all the samples, of which more than 43% were singletons (Table 1). The Good's coverage ratio ranged between 83 and 98%. A greater diversity (H') of OTUs was found in the sediment samples (5.7 ± 0.9). The water samples presented the lowest diversity (3.5 ± 0.5), while the mucus samples were more diverse, with values ranging from 1.2 to 5.8.

In all the samples, most of the OTUs were classified as Proteobacteria (Figure 1). A higher proportion of Cyanobacteria sequences were found in water samples, and Actinobacteria and Acidobacteria sequences were more frequent in sediment samples. However, no substantial differences of phylum distribution were observed among the habitats, seasons, sampling sites, or coral species. Among the

Proteobacteria, Alphaproteobacteria dominated in the water samples, while Gammaproteobacteria dominated in the samples of sediment and the mucus of *P. caribaeorum*, *T. coccinea*, and *M. hispida*. A higher proportion of Betaproteobacteria was found in the mucus samples of the scleractinian corals *M. hispida* (1.2%), *M. decactis* (1.6%), and *T. coccinea* (2.8%) than in the other environments (Water = 0.53%, Sediment = 0.51%, and *P. caribaeorum* = 0.53%).

The analysis of similarities (ANOSIM) indicated that the OTU composition was significantly different among the communities found in the three habitats (mucus, water, and sediment, $P = 0.0001$).

The n-MDS was performed using Bray-Curtis similarities between the samples (Figure 2; stress value = 0.1554). In Figure 2, there is a clear grouping of the samples from water and of the samples from sediment. According to Figures 2 and 3, and the ANOSIM analysis (Table 3), samples of *P. caribaeorum* mucus were the most dissimilar, and there was no clear differentiation between the mucus samples from the Scleractinian coral species.

The ANOSIM analysis showed that there were no significant differences between the mucus communities in the two seasons (comparison of the summer and winter mucus samples gave P-values of 0.329 (*M. hispida*), 0.3303 (*M. decactis*), 0.3345 (*P. caribaeorum*), and 0.6665 (*T. coccinea*)). In the case of the water and sediment samples, the differences between the summer and winter were significant ($P = 0.0004$ and 0.0011 , respectively). In our study, the

Table 1 | Sample information

Sample	Habitat	Coral species	Season	Number of reads	Number of OTUs	Good's coverage ratio	Shannon index (H')
BD12A	Water	<i>M. decactis</i>	Winter	26122	1467	97.28%	4.11
BD12M	Mucus	<i>M. decactis</i>	Winter	3508	677	88.28%	4.744
BD12S	Sediment	<i>M. decactis</i>	Winter	41722	5200	93.75%	6.506
BD14A	Water	<i>M. decactis</i>	Winter	11911	775	96.55%	3.501
BD14M	Mucus	<i>M. decactis</i>	Winter	6595	899	92.27%	4.584
BD14S	Sediment	<i>M. decactis</i>	Winter	27542	3623	93.25%	6.072
BD22A	Water	<i>M. decactis</i>	Summer	35164	1516	97.65%	3.964
BD22M	Mucus	<i>M. decactis</i>	Summer	23931	3155	92.62%	5.761
BD24A	Water	<i>M. decactis</i>	Summer	24865	1090	97.61%	3.555
BD24S	Sediment	<i>M. decactis</i>	Summer	20895	3430	91.05%	6.409
BT12A	Water	<i>T. coccinea</i>	Winter	16672	1068	96.88%	3.433
BT12M	Mucus	<i>T. coccinea</i>	Winter	15069	1605	94.28%	4.793
BT12S	Sediment	<i>T. coccinea</i>	Winter	5434	891	90.60%	4.973
BT14A	Water	<i>T. coccinea</i>	Winter	31259	1037	98.58%	3.26
BT14M	Mucus	<i>T. coccinea</i>	Winter	15538	1173	96.09%	4.178
BT14S	Sediment	<i>T. coccinea</i>	Winter	6065	1207	88.77%	5.52
BT22A	Water	<i>T. coccinea</i>	Summer	18878	986	97.18%	3.376
BT22M	Mucus	<i>T. coccinea</i>	Summer	9874	1399	91.79%	5.063
BT22S	Sediment	<i>T. coccinea</i>	Summer	12661	1848	91.53%	4.566
BT24A	Water	<i>T. coccinea</i>	Summer	24438	1143	97.50%	3.672
BT24M	Mucus	<i>T. coccinea</i>	Summer	16295	2845	90.71%	6.002
BT24S	Sediment	<i>T. coccinea</i>	Summer	12640	3246	85.26%	6.957
SM12A	Water	<i>M. hispida</i>	Winter	25212	843	98.30%	3.203
SM12M	Mucus	<i>M. hispida</i>	Winter	6315	1014	91.24%	5.143
SM14M	Mucus	<i>M. hispida</i>	Winter	6550	1286	88.76%	5.341
SM14S	Sediment	<i>M. hispida</i>	Winter	16921	1257	96.28%	3.886
SM22A	Water	<i>M. hispida</i>	Summer	23455	689	98.50%	2.595
SM22M	Mucus	<i>M. hispida</i>	Summer	13831	1276	94.94%	4.392
SM22S	Sediment	<i>M. hispida</i>	Summer	8565	2382	83.79%	6.706
SM24A	Water	<i>M. hispida</i>	Summer	16956	1014	96.76%	3.467
SM24M	Mucus	<i>M. hispida</i>	Summer	20676	3032	92.55%	5.933
SM24S	Sediment	<i>M. hispida</i>	Summer	14721	2286	91.30%	5.037
SP12M	Mucus	<i>P. caribaeorum</i>	Winter	3726	241	95.89%	1.306
SP14A	Water	<i>P. caribaeorum</i>	Winter	3546	670	88.47%	4.824
SP14M	Mucus	<i>P. caribaeorum</i>	Winter	28080	1830	96.60%	3.562
SP14S	Sediment	<i>P. caribaeorum</i>	Winter	17378	2336	93.03%	5.777
SP22M	Mucus	<i>P. caribaeorum</i>	Summer	7487	1274	89.35%	4.454
SP22S	Sediment	<i>P. caribaeorum</i>	Summer	13420	3161	86.38%	6.728
SP24A	Water	<i>P. caribaeorum</i>	Summer	37184	1342	98.10%	3.253
SP24M	Mucus	<i>P. caribaeorum</i>	Summer	10313	1582	90.61%	4.441
SP24S	Sediment	<i>P. caribaeorum</i>	Summer	13957	3234	86.92%	6.759

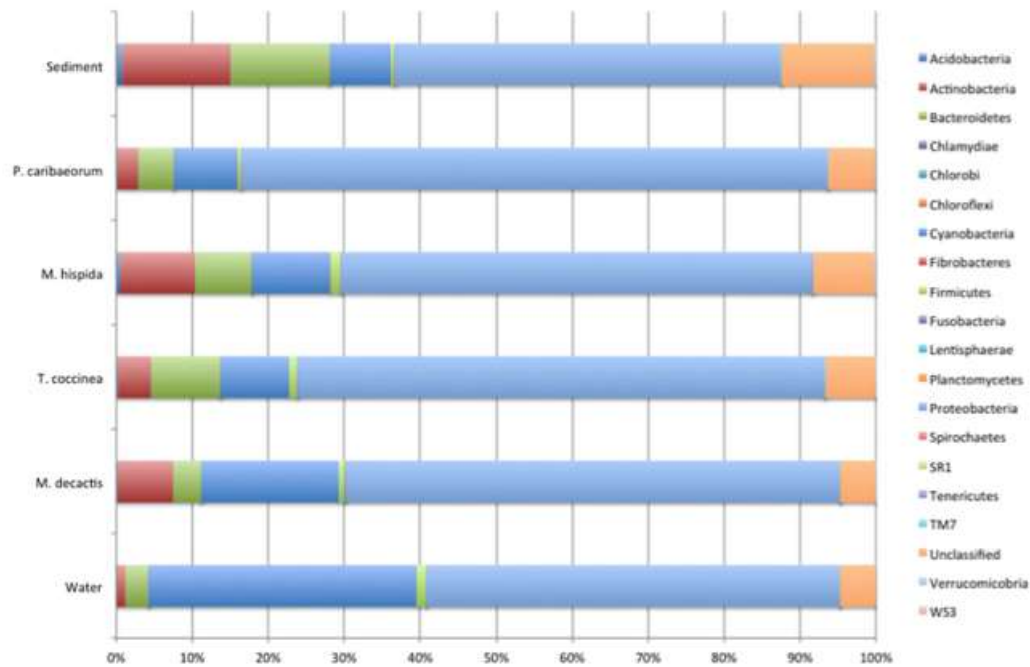


Figure 1 | Average of phylum relative abundance in each habitat.

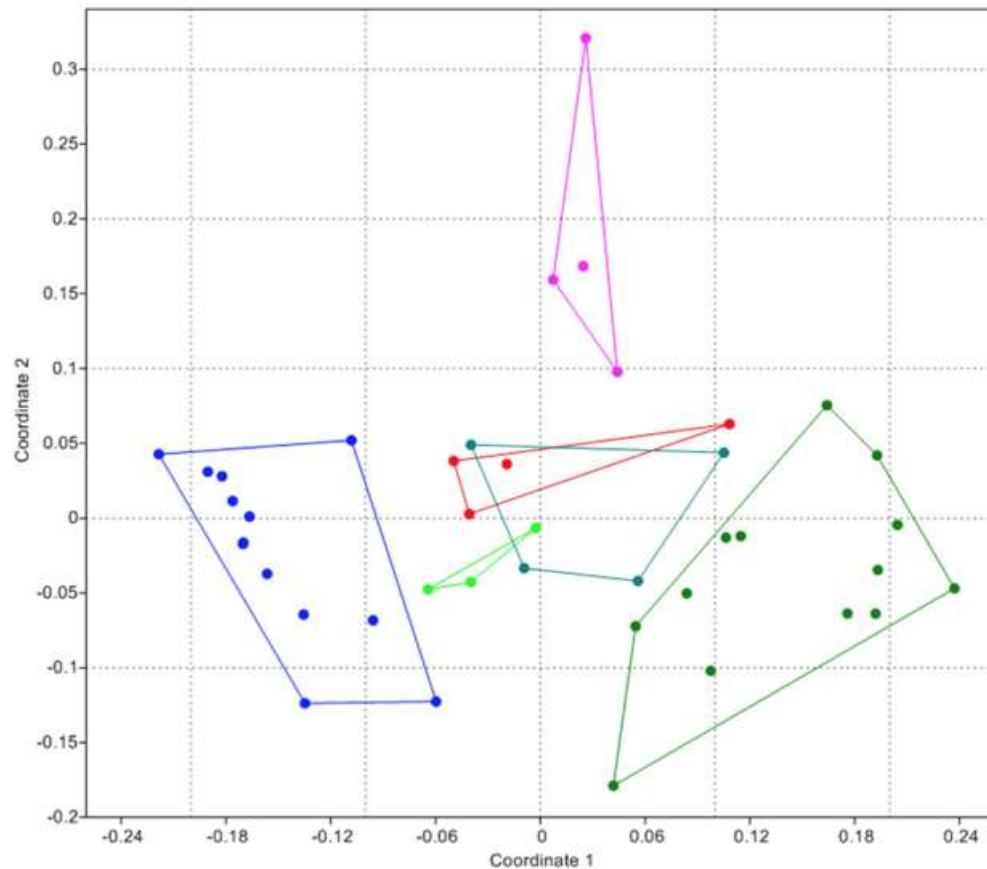


Figure 2 | Nonmetric multidimensional scaling (nMDS) plots of the first 2 dimensions based on Bray-Curtis dissimilarities for water (dark blue), sediment (dark green), *M. hispida* mucus (light blue), *M. decactis* (light green), *T. coccinea* (red), and *P. caribaeorum* (pink). The stress value is 0.1554.

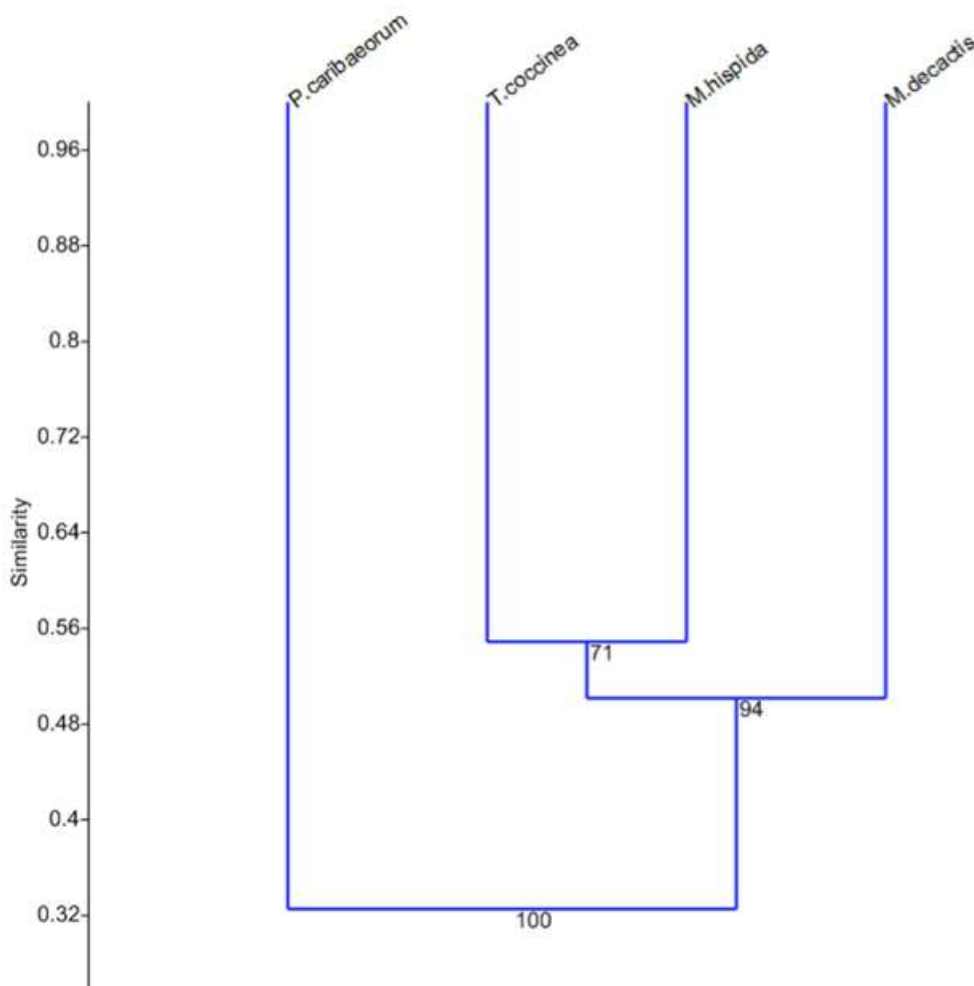


Figure 3 | UPGMA cluster analysis of the mucus communities of the four coral species studied. The UPGMA clustering was based on Bray-Curtis dissimilarities using the mean of the relative abundance of OTUs for each coral species. Bootstrap values (in%) for 1000 replicates are given at the nodes.

communities of water and sediment did not differ significantly between the two sampling sites ($P = 0.1749$ and 0.1723 , respectively). The difference between the sampling sites was significant for the samples of mucus ($P = 0.0124$), however the difference was not significant ($P = 0.0808$) when the samples of *Palythoa* were excluded from the analysis.

Most abundant OTUs for each habitat. The SIMPER analysis highlighted the OTUs primarily responsible for the observed differences between the habitats studied, using the relative abundances of the OTUs in each habitat. The five main results for each habitat are presented in Table S1, and their relative abundances are given in Table S2 (supplementary material). The OTU 23763, which was mainly associated with the water samples, was classified to the GPIIA group of Cyanobacteria, which includes the genera *Prochlorococcus* and *Synechococcus* that contribute most to the primary production in oligotrophic oceans¹⁸.

Some of the OTUs most related with *M. decactis* presented similarity with bacterial genera often associated with the degradation of organic pollutants. These included OTU 6997, which showed similarity with *Rhodococcus erythropolis*¹⁹, OTU 23270, related to *Sphingomonas*²⁰, and OTU 19915, classified as *Brachy bacterium*²¹. In addition, OTU 6481, attributed to the *Acinetobacter* genus, has been found in great abundance in bleached corals²².

The OTUs of *M. hispida* mucus, identified by SIMPER as important for distinction of the microbial community, were only found in the colonies of this species, but in low abundance. None showed similarity with previously described microorganisms. However, four of them (14290, 20636, 25133, and 23022) showed greater similarity in databases with sequences of 16S rDNA libraries of Brazilian coral.

The OTU 7634 dominated in the communities of *P. caribaeorum* mucus, representing around 40% of all reads found in these samples. This OTU and another two, also identified by SIMPER analysis, were classified as Gammaproteobacteria, and showed similarity to sequences of 16S rDNA libraries of the soft coral *Sinularia* sp subjected to thermal stress.

One of the OTUs of *T. coccinea*, 17001, was classified in the genus *Tenacibaculum* and showed similarity with the sequence of 16S libraries of corals affected by black-band disease. The OTU 9209, classified as Alphaproteobacteria, showed similarity with a sequence of 16S from the Scleractian cold-water coral *Lophelia pertusa*. The OTU 16320 was classified in the genus *Haliogium*, a marine myxobacterium isolated in Japan that has known antifungal and antibiotic properties²³.

The OTU 16689, associated with sediment, was classified to the nitrogen-fixing genus *Mesorhizobium*²⁴, and the OTU 20185 was classified as a Gammaproteobacterium, which showed 100% similarity with a sequence from a 16S library of bleached *Siderastrea stellata*.



Table 2 | Information about species-specific OTUs

OTU	RDP Classifier [bootstrap value]	blastn (identity)	Description (GENBANK)	Title (GENBANK)	Authors (GENBANK)	Coral mucus
14290	Alphaproteobacteria[88%]	HQ837587 (98%)	uncultured bacterium; coral reef	Bacterial communities associated with three endemic <i>Mussismilia</i> species in disturbed coral reef environment from Abrolhos Bank, Brazil	Castro, A. and Kruger, R.	<i>M. hispida</i>
21841	Alphaproteobacteria[92%]	FJ628227.1 (97%)	uncultured bacterium; brackish water from anoxic fjord	Phylogenetic diversity of transition and anoxic zone bacterial communities within a near-shore anoxic basin: Nitinat Lake	Schmidtova, J., et al.	<i>M. hispida</i>
23022	Chromatiales[55%]	FJ216075 (99%)	uncultured gamma proteobacterium; coral	Archaea, bacteria, and algal plastids associated with the reef-building corals <i>Siderastrea stellata</i> and <i>Mussismilia hispida</i> from Buzios, South Atlantic Ocean, Brazil	Lins-de-Barros, M.M., et al.	<i>M. hispida</i>
6336	Gammaproteobacteria[99%]	JF268381.1 (94%)	uncultured bacterium; New Zealand cold seep	Microbial communities of marine methane seeps at Hikurangi Margin (New Zealand)	Ruff, S.E., et al.	<i>T. coccinea</i>
15129	Alphaproteobacteria[51%]	FJ041420.1 (98%)	uncultured bacterium; Lophelia pertusa (scleractinian coral)	Culture-independent characterization of bacterial communities associated with the cold-water coral Lophelia pertusa in the northeastern Gulf of Mexico	Kellogg, C.A., et al.	<i>T. coccinea</i>
11074	Alphaproteobacteria[59%]	FJ041420.1 (97%)	uncultured bacterium; Lophelia pertusa (scleractinian coral)	Culture-independent characterization of bacterial communities associated with the cold-water coral Lophelia pertusa in the northeastern Gulf of Mexico	Kellogg, C.A., et al.	<i>T. coccinea</i>
9266	Gammaproteobacteria[89%]	AB611839.1 (94%)	uncultured gamma proteobacterium; polyp gastric cavity	Biological and chemical characteristics of the coral gastric cavity	Agostini, S., et al.	<i>P. caribaeorum</i>
3573	Gammaproteobacteria[97%]	JF721992.1 (93%)	bacterium HQE2; <i>Siyela clava</i>	Isolation and phylogenetic analysis of bacteria from the <i>Siyela clava</i>	Miao, T., et al.	<i>P. caribaeorum</i>

In addition to these results, genera present in at least two coral species, identified from mucus libraries, included *Achromobacter* (Betaproteobacteria), *Acidovorax* (Betaproteobacteria), *Agarivorans* (Gammaproteobacteria), *Faecalibacterium* (Firmicutes), *Fibrobacter* (Fibrobacter), *Flammeovirga* (Bacteroidetes), *Marinobacter* (Gammaproteobacteria), *Marmoricola* (Actinobacteria), *Psychrobacter* (Gammaproteobacteria), *Serratia* (Gammaproteobacteria), and *Zunongwangia* (Bacteroidetes). *Marmoricola* and *Psychrobacter* were found in the four coral species.

Species-specific OTUs. We found species-specific OTUs in *P. caribaeorum*, *T. coccinea*, and *M. hispida*. All these OTUs were present in low abundance (between 20 and 190 reads, around 0.02% of the total reads for each coral).

The OTUs 23022, 14290, and 21841 were only found in three of the four colonies of *M. hispida*. The OTUs 6336, 11074, and 15129 were only found in the four colonies of *T. coccinea*. The OTUs 9266 and 3573 were found in the four colonies of *P. caribaeorum*. Table 2 presents information about these OTUs.

Most of the genera that were found associated with mucus are aerobic and heterotrophic, and are commonly found in a wide range of hosts. These include *Acinetobacter*, *Brachybacterium*, *Escherichia*, *Janthinobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, and *Tenacibaculum*. However, some of the species-specific OTUs related to the Scleractinian corals were classified to autotrophic bacterial groups, such as Alphaproteobacteria and Chromatiales (purple sulfur bacteria).

Discussion

The bacterial communities found in the three habitats (mucus, water, and sediment) were significantly different, which is in agreement with most of the studies published to date^{25,26}. Some bacterial groups and OTUs were most related to a determined habitat. For example, the OTUs attributed to Betaproteobacteria, a group that includes the *Janthinobacterium* genus, were found to be most associated with the mucus of *M. hispida*, *M. decactis*, and *P. caribaeorum*. *Janthinobacterium*, previously belonging to the Chromobacterium genus, is a gram-negative violacein-producing Betaproteobacterium found in soil, water, and some animal surfaces^{27,28}. Members of this family have already been found in the mucus of corals, and Kooperman *et al.*²⁹ suggested that they can be an obligate symbiont of *Fungia granulosa*.

Our results indicate not only that the microbial community of the mucus was distinct from the surrounding environment, but also that it was more stable throughout the seasons than the communities of the water column and the sediment. We suggest that the community of the mucus is less influenced by physical factors, such as temperature, compared to the communities in the surrounding environment. Our results differ from those obtained by Ceh *et al.*¹⁶, who studied the microbial communities of three coral species in Australia and concluded that seasonal changes were more important in determining the microbiota than the coral species and the spatial separation of coral. We believe that the stability found in the mucus community in our study can be attributed to the antimicrobial properties of the mucus. Studies have demonstrated the bacterial growth inhibitory activity of the mucus of several coral species^{3,30}, and we have observed this property for the mucus of the coral species studied in this work (unpublished data). As suggested by Kvennefors *et al.*¹⁵, host and microbial factors can be responsible for the selection and maintenance of the bacteria that can inhabit the coral tissues.

The results also indicated that host phylogeny and genetic factors might be more important in determining the bacterial community than the presence of the zooxantellae (found in association with *P. caribaeorum*, *M. hispida*, and *M. decactis*, but not *T. coccinea*), since we observed that the bacterial community of the zoanthid *P. caribaeorum* was different to the communities of the other species



Table 3 | P-values derived from ANOSIM pairwise comparisons of bacterial community composition values using Bray-Curtis values. The values highlighted in bold are statistically significant ($P < 0.05$)

	Water	<i>M. decactis</i>	<i>T. coccinea</i>	<i>M. hispida</i>	<i>P. caribaeorum</i>	Sediment
Water	0	0.0017	0.0008	0.0004	0.0005	0.0001
<i>M. decactis</i>	0.0017	0	0.0893	0.171	0.0278	0.0052
<i>T. coccinea</i>	0.0008	0.0893	0	0.1748	0.031	0.0008
<i>M. hispida</i>	0.0004	0.171	0.1748	0	0.0311	0.0345
<i>P. caribaeorum</i>	0.0005	0.0278	0.031	0.0311	0	0.0007
Sediment	0.0001	0.0052	0.0008	0.0345	0.0007	0

studied. This supports the notion of the existence of Scleractinian-specific associations³¹.

We have found OTUs that seem to be specific for each coral species. The species-specific OTUs of *P. caribaeorum* are related to the *Endozoicomonas* genus, which belongs to the order Oceanospirillales. *Endozoicomonas* and Oceanospirillales bacteria have been frequently found associated with corals, especially of the *Porites* spp. genus³². They dominate the community of *Porites astreoides*³³, and the species *Endozoicomonas montiporae* was first isolated from the coral *Montipora aequituberculata*³⁴. The role of these bacteria and the characteristics that allow their widespread association with marine organisms are still unknown³².

One of the most interesting species-specific OTUs was 23022, only found in the mucus of *M. hispida* and classified to the order Chromatiales, a group of microaerophilic or anaerobic, photosynthetic, and sulfur-oxidizing bacteria³⁵. The major hits of this OTU in the databases are with sequences of 16S libraries of *Mussismilia* species, which is strong evidence for the specificity of this OTU to *M. hispida*. In corals, phototrophic sulfur-oxidizing bacteria are usually found in the microbial consortia that cause black band disease. This is a major disease affecting corals, and is characterized by degradation of the tissue of the animal by the action of hydrogen sulfide (H₂S) produced by sulfate-reducing bacteria³⁶, such as those found in sediment. Childress & Girguis³⁷ suggested that the H₂S detoxification function of sulfur-oxidizing bacteria in the symbiotic relationships with marine animals is not as important as the inorganic carbon fixing function. Nevertheless, we believe that H₂S detoxification may be the main function required in a relationship between zooxanthellate corals and sulfur-oxidizing bacteria, since algae endosymbionts are responsible for production of most of the energy used by the corals. Thus, our hypothesis is that the presence (at low density) of phototrophic sulfur-oxidizing bacteria, such as those characterized by the OTU 23022, could assist in the balance of sulfur compounds in the coral tissues, protecting the host against the action of H₂S. Raina *et al.*^{38,39} have suggested the role of sulfur compounds in determining the bacterial communities associated with corals. Based on these observations, we believe that more studies are needed to investigate the role of sulfur compounds in the coral holobiont, in order to elucidate their importance in species-specific associations between bacteria and corals.

We emphasize the importance of including coral reef sediments in future studies of coral microbiota. As observed in this study as well as by Schöttner *et al.*^{25,26}, sediment presented the most diverse bacterial community among the coral reef habitats studied. We observed that mucus shared more OTUs with sediment than with water, suggesting that sediments might act as a seed bank of bacteria that could colonize the coral surfaces. Furthermore, sediment can also provide a reservoir of opportunistic coral pathogens, so that the study of this habitat could aid in understanding bacterial dynamics in coral reef environments.

We are aware that it is not possible to affirm that the species-specific OTUs found in this study represent mucus residents, because (as discussed by Lema *et al.*¹⁶) the ephemeral nature of the coral mucus could preclude strong bacterial associations. Hence, many

of these bacteria may actually inhabit the coral tissues, which could explain their low density in the mucus samples.

Methods

Sample collection. The samples were obtained during the winter of 2010 (June) and the summer of 2011 (January), at two locations: São Sebastião Channel (S 23°51'467 W 45°25'867) and Búzios Island (S 23°48'157 W 45°07'181) in São Paulo State, Brazil. The sea surface temperature was around 20°C in the winter and 28°C in the summer at the two locations. The water depth was 9 m at São Sebastião Channel and 11 m at Búzios Island. The samples of *Mussismilia hispida* (Scleractinia) and *Palythoa caribaeorum* (Zoantharia) were collected from the São Sebastião Channel, and the samples of *Tubastraea coccinea* (Scleractinia) and *Madracis decactis* (Scleractinia) were collected from Búzios Island.

From each coral colony (apparently healthy) we collected 10 ml of mucus, 1 liter of surrounding water directly above the colony, and 50 ml of sediment directly below the colony. Four colonies of each coral species were sampled, spaced around 10 m from each other. Water samples were collected in sterile plastic bottles and first filtered through sterile filter paper to remove debris and then vacuum filtered through a 0.22 micrometer Millipore membrane, which was used for the DNA isolation. Sediment samples were collected in sterile 50 ml centrifugation tubes. The mucus samples were collected using sterile syringes. All the samples were stored on ice during transport to the laboratory, and frozen at -20°C until DNA isolation was performed.

DNA isolation and 16S library construction and pyrosequencing. Total DNA of all samples was isolated using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), according to the manufacturer's instructions for Gram-positive bacteria, using a pellet of the environmental sample (or a membrane in the case of water samples, instead of the pellet of cells). The average yield was around 10 ng/μL of DNA for each sample.

The amplification of the V3 region of the 16S rDNA was performed according to Clingenpeel *et al.*⁴⁰, using the primers 338F (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG) and 533R (TTACCGCGCTGCTGGCAG)⁴¹. The amplification reactions (final volume 25 μL) employed 3–10 ng of DNA, 1U AccuPrime Pfx® DNA polymerase (Invitrogen), AccuPrime Pfx Reaction Mix® 1X (Invitrogen), and 0.4 mM of each primer. Amplification was performed under the following conditions: initial denaturation at 94°C for 1 min, and 25 cycles at 94°C for 30 seconds, 62°C for 1 min, and 72°C for 1 min. After these 25 cycles, a further five cycles were performed, using the same conditions, in order to add the specific barcodes from each sample and the adapters A and B (reaction with final volume of 50 μL). The amplification products were purified with the GFX PCR and DNA Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), quantified using the Qubit Kit (Invitrogen), and the quality (integrity and presence of a unique band) was confirmed by 1% agarose gel electrophoresis. An equimolar mixture of the samples from each library (summer and winter) was employed in order to obtain 5000 ng of PCR product in total, with a minimum concentration of 20 ng/μL. The winter library was composed of 20 samples: 6 of water, 8 of mucus, and 6 of sediment. The summer library was composed of 21 samples: 7 of water, 7 of mucus, and 7 of sediment. The amplicons were sequenced with the 454 technology, a GS FLX Roche Company platform.

Sequence processing and statistical analysis. The initial processing of the sequences was carried out with the package QIIME (<http://qiime.org/>). The sequences were screened according to quality (minimum of 25) and size (between 150–240 bp). No ambiguous bases or mismatches were admitted in the sequence of the primers, and we checked for the existence of chimeras. The sequences with similarity greater than or equal to 97% were grouped into operational taxonomic units (OTUs), and the taxonomic classification was performed using the RDP (Ribosomal Database Project: <http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) classification threshold of 80%. Rarefaction curves were also constructed with the QIIME package. The Good's coverage ratio (C) was calculated according to the formula $C = 1 - \frac{n_i}{N}$, where n_i is the number of OTUs that were sampled only one time (singletons) and N is the total number of sequences in the sample. The Shannon index (H) was calculated according to the formula $H = -\sum p_i \ln p_i$, where p_i is the proportion of OTU i relative to the total number of OTUs.

The community analysis was performed according to Laverock *et al.*⁴² and Theis *et al.*⁴³. Multidimensional scaling (n-MDS) analysis was used to obtain the



community similarities (Bray-Curtis values), employing the relative abundances of OTUs in each sample. Analysis of similarities (ANOSIM) was used to test the hypothesis that bacterial communities from the same habitat were more similar to each other than to communities from different habitats. Similarity percentage (SIMPER) analysis was used to identify the most abundant OTUs for each habitat, employing the relative abundances of OTUs in each sample. The UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) clustering was based on Bray-Curtis dissimilarities using the average between the relative abundances of OTUs of all the samples from each coral species. Bootstrapping with 1000 resamplings was performed to determine the robustness of the clustering. All these analyses were performed with the statistical software PAST (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

We have considered as species-specific OTUs those found in only one coral species and in at least three of the four colonies studied, since they are not necessarily a symbiont found in all the individuals of the species.

- Lesser, M. P. *et al.* Nitrogen fixation by symbiotic cyanobacteria provides a source of nitrogen for the scleractinian coral *Montastraea cavernosa*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **346**, 143–152 (2007).
- Ritchie, K. B. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **322**, 1–14 (2006).
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R. & Zilber-Rosenberg, I. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 355–362 (2007).
- Shnit-Orland, M. & Kushmaro, A. Coral mucus-associated bacteria: a possible first line of defence. *FEMS Microbiol. Ecol.* **67**, 371–380 (2009).
- Ainsworth, T. D. & Hoegh-Guldberg, O. Bacterial communities closely associated with coral tissues vary under experimental and natural reef conditions and thermal stress. *Aquat. Biol.* **4**, 289–296 (2009).
- Thurber, R. V. *et al.* Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. *Environ. Microbiol.* **11**, 2148–2163 (2009).
- Littman, R. A., Bourne, D. G. & Willis, B. L. Responses of coral-associated bacterial communities to heat stress differ with Symbiodinium type on the same coral host. *Mol. Ecol.* **19**, 1978–90 (2010).
- Reshef, L., Koren, O., Loya, Y., Zilber-Rosenberg, I. & Rosenberg, E. The coral probiotic hypothesis. *Environ. Microbiol.* **8**, 2067–2073 (2006).
- Fieseler, L., Horn, M., Wagner, M. & Hentschel, U. Discovery of the novel candidate phylum “Poribacteria” in marine sponges. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3724–3732 (2004).
- Fraune, S. & Bosch, T. C. G. Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan *Hydra*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **32**, 13146–13151 (2007).
- Di Camillo, C. G. *et al.* Biodiversity of Prokaryotic Communities Associated with the Ectoderm of *Ectopleura crocea* (Cnidaria, Hydrozoa). *PLOS One* **7**, e39926 (2012).
- Rohwer, F., Seguritan, V., Azam, F. & Knowlton, N. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **243**, 1–10 (2002).
- Reis, A. M. *et al.* Bacterial diversity associated with the Brazilian endemic reef coral *Mussismilia braziliensis*. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 1378–87 (2009).
- de Castro, A. P. *et al.* Bacterial community associated with healthy and diseased reef coral *Mussismilia hispida* from eastern Brazil. *Microb. Ecol.* **59**, 658–667 (2010).
- Kvennefors, E. C. *et al.* Regulation of bacterial communities through antimicrobial activity by the coral holobiont. *Microbiol. Ecol.* **63**, 605–618 (2012).
- Ceh, J., van Keulen, M. & Bourne, D. G. Coral-associated bacterial communities on Ningaloo Reef, Western Australia. *FEMS Microbiol. Ecol.* **75**, 134–144 (2011).
- Lema, K. A., Willis, B. L. & Bourne, D. G. Corals form characteristic associations with symbiotic nitrogen-fixing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **18**, 3136–3144 (2012).
- Friedline, C. J., Franklin, R. B., McCallister, S. L. & Ruvera, M. C. Microbial community diversity of the eastern Atlantic Ocean reveals geographic differences. *Biogeosciences Discuss.* **9**, 109–150 (2012).
- Aoshima, H. *et al.* Improvement of heavy oil degradation by *Rhodococcus erythropolis* C2. *J. Environ. Biotechnol.* **5**, 107–109 (2006).
- Nimatzahroh, M. G. In-vitro study of interaction between photooxidation and biodegradation of 2-methylphenanthrene by *Sphingomonas* sp. 2MP11. *Chemosphere* **38**, 2501–2507 (1999).
- Chou, J. H. *et al.* *Brachybacterium phenoliresistens* sp. nov., isolated from oil-contaminated coastal sand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 2674–2679 (2007).
- Koren, O. & Rosenberg, E. Bacteria associated with the bleached and cave coral *Oculina patagonica*. *Microbiol. Ecol.* **55**, 523–529 (2008).
- Fudou, R. *et al.* Haliangicin, a novel antifungal metabolite produced by a marine myxobacterium. 2. Isolation and structural elucidation. *J. Antibiot.* **54**, 153–156 (2001).
- Kaneko, T. *et al.* Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* **7**, 331–338 (2000).
- Schöttner, S. *et al.* Inter- and intra-habitat bacterial diversity associated with cold-water corals. *ISME J.* **3**, 756–759 (2009).
- Schöttner, S., Wild, C., Hoffmann, F., Boetius, A. & Ramette, A. Spatial scales of bacterial diversity in cold-water coral reef ecosystems. *PLoS One* **7**, e32093 (2012).
- Grice, E. A. A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res.* **18**, 1043–1050 (2008).
- Brucker, R. M. *et al.* Amphibian chemical defense: Antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*. *J. Chem. Ecol.* **34**, 1422–1429 (2008).
- Kooperman, N., Ben-Dov, E., Kramarsky-Winter, E., Barak, Z. & Kushmaro, A. Coral mucus-associated bacterial communities from natural and aquarium environments. *FEMS Microbiol. Lett.* **276**, 106–113 (2007).
- Geffen, Y., Ron, E. Z. & Rosenberg, E. Regulation of release of antibacterials from stressed scleractinian corals. *FEMS Microbiol. Lett.* **295**, 103–109 (2009).
- Kellogg, C. A., Lisle, J. T. & Galkiewicz, J. P. Culture-independent characterization of bacterial communities associated with the cold-water coral *Lophelia pertusa* in the northeastern Gulf of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2294–2303 (2009).
- Speck, M. D. & Donachie, S. P. Widespread Oceanospirillaceae bacteria in *Porites* spp. *J. Mar. Biol.* **2012** (2012).
- Morrow, K. M., Moss, A. G., Chadwick, N. E. & Liles, M. R. Bacterial associates of two Caribbean coral species reveal species-specific distribution and geographic variability. *Appl. Environ. Microbiol.*, epub ahead of print (2012).
- Yang, C. S. *et al.* *Endozoicomonas montiporae* sp. nov., isolated from the encrusting pore coral *Montipora aequituberculata*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 1158–62 (2010).
- Frigaard, N.-U. & Dahl, C. Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **54**, 103–200 (2008).
- Stanić, D., Oehle, S., Gantar, M. & Richardson, L. L. Microcystin production and ecological physiology of Caribbean black band disease cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* **13**, 900–910 (2011).
- Childress, J. J. & Girguis, P. R. The metabolic demands of endosymbiotic chemoautotrophic metabolism on host physiological capacities. *J. Exp. Biol.* **214**, 312–325 (2010).
- Raina, J. B., Tapiolas, D., Willis, B. L. & Bourne, D. G. Coral-associated bacteria and their role in the biogeochemical cycling of sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 3492–3501 (2009).
- Raina, J. B., Dinsdale, E. A., Willis, B. L. & Bourne, D. G. Do the organic sulfur compounds DMSP and DMS drive coral microbial associations? *Trends Microbiol.* **18**, 101–108 (2010).
- Clingenpeel, S. *et al.* Yellowstone Lake: high-energy geochemistry and rich bacterial diversity. *Environ. Microbiol.* **13**, 2172–2185 (2011).
- Huse, S. M. *et al.* Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genet.* **4**, e1000255 (2008).
- Laverock, B. *et al.* Bioturbating shrimp alter the structure and diversity of bacterial communities in coastal marine sediments. *ISME J.* **4**, 1531–1544 (2010).
- Theis, K. R., Schmidt, T. M. & Holekamp, K. E. Evidence for a bacterial mechanism for group-specific social odors among hyenas. *Sci. Rep.* **2**, 615.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2010/50247-4). CC received a fellowship from FAPESP (FAPESP 2010/02325-6). LMMO received a research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors thank CEBIMar-USP (Centro de Biologia Marinha, Universidade de São Paulo) for providing logistic and laboratory facilities during sample collection.

Author contributions

L.M.M.O., C.C. and T.T.T. conceived the work. C.C. performed the experiments and wrote the manuscript. All authors reviewed the final manuscript.

Additional information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/scientificreports>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

License: This work is licensed under a Creative Commons

Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

How to cite this article: Carlos, C., Torres, T.T. & Ottoni, L.M.M. Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species. *Sci. Rep.* **3**, 1624; DOI:10.1038/srep01624 (2013).

Supplementary information is presented in the Appendix I.

CAPÍTULO 2

Metagenoma de *Mussismilia hispida* e *Madracis decactis*:

Foco em sequências virais

2.1 INTRODUÇÃO

A estrutura e a dinâmica das comunidades microbianas associadas a corais têm sido largamente estudadas (Carlos *et al.*, 2013; Rodriguez-Lanetty *et al.*, 2013; Cárdenas *et al.*, 2012; Sharp *et al.*, 2012; Meron *et al.*, 2012; Witt *et al.*, 2011). Diversos trabalhos têm demonstrado que as funções das microbiotas associadas a macro-organismos são mais importantes para se determinar a estabilidade do holobionte do que sua composição taxonômica (Krediet *et al.*, 2013; Burke *et al.*, 2011). Entretanto, os poucos estudos funcionais de metagenoma da microbiota de corais (Garcia *et al.*, 2013; Vega Thurber *et al.*, 2009; Wegley *et al.*, 2007; Yokouchi *et al.*, 2006) não conseguiram identificar funções enriquecidas ou superabundantes nessa comunidade, principalmente devido à dificuldade em se obter DNA bacteriano a partir de amostras de coral. Geralmente, os metagenomas de corais são enriquecidos em sequências da alga *Symbiodinium*, em sequências mitocondriais e em sequências do próprio hospedeiro (Wegley *et al.*, 2007). Metagenomas de corais geralmente são enriquecidos em sequências de origem viral (Littman *et al.*, 2011; Wegley *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2013), o que reforça que estudos da microbiota de coral devem considerar os vírus como uma parte importante do holobionte.

Neste capítulo, o metagenoma das espécies formadoras de recifes *Mussismilia hispida* e *Madracis decactis* foi sequenciado a fim de se identificar suas funções únicas ou abundantes, funções estas que podem estar relacionadas com o estabelecimento de relações entre corais e bactérias. Para isso, foram feitas análises comparativas entre metagenomas disponíveis em bancos de dados.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Coleta dos corais

Colônias dos corais *Mussismilia hispida* e *Madracis decactis* foram coletadas pelo CEBIMAR/USP, em março de 2012, na Ilha de Búzios, São Paulo (23°48'157"S, 45°07'181"W). A temperatura da superfície do mar foi registrada em 22°C e os corais foram coletados a uma profundidade de 11 metros. As colônias foram transportadas congeladas para o laboratório do CBMEG/Unicamp e armazenadas a -20 °C até o isolamento do DNA.

2.2.2 Isolamento do DNA e sequenciamento

O metagenoma da comunidade bacteriana associado aos corais escleractíneos *Mussismilia hispida* e *Madracis decactis* foi sequenciado utilizando-se a tecnologia 454, no aparelho GS FLX da Roche Company. Para isso, vários pólipos de uma mesma colônia de cada espécie de coral foram lavados e agitados em vortex com TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1mM, pH 8,0). Após um breve *spin*, o líquido sobrenadante foi transferido para outro tubo. As células procarióticas foram coletadas a partir da centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a extração de DNA foi feita utilizando-se o kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose e a quantificação foi feita por espectrofotômetro.

Para o sequenciamento no aparelho GS FLX da Roche Company, são necessários 5000 ng de DNA. Assim sendo, foi realizada a amplificação genômica por MDA (*Multiple Displacement Amplification*) do DNA obtido. A amplificação foi realizada utilizando-se o REPLI-g Midi-kit da

QIAGEN, seguindo-se as instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose e a quantificação foi feita por espectrometria com o GeneQuant 100 *Spectrophotometer* da GE Healthcare. A fluorometria foi realizada com o Qubit 2.0 da Invitrogen.

2.2.3 Análises das sequências e estatística

O pré-processamento das *reads* consiste na preparação das *reads* para a anotação. Os passos seguidos foram: 1) controle de qualidade 2) remoção das sequências *barcodes* e 3) remoção de sequências mitocondriais e de vetores (possíveis contaminantes). O programa PRINSEQ (Schmieder & Edwards, 2011) foi utilizado para o controle da qualidade das *reads*. As *reads* foram triadas pela qualidade (mínima de 25), tamanho (mínimo de 300 pb) e número de bases indeterminadas (máximo de 5). Os *barcodes* foram retirados das *reads* com o programa TagCleaner (Schmieder *et al.*, 2010).

Reads com identidade igual ou maior a 95% com sequências do banco de dados RefSeq (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/refseq/>) de vetores ou mitocondrial foram retiradas utilizando-se o script `exclude_seqs_by_blast.py`. As sequências foram dereplicadas e anotadas utilizando-se a plataforma automática MG-RAST (Meyer *et al.*, 2008) e a plataforma automática Comet (Ligner *et al.*, 2011). O programa Xipe (<http://edwards.sdsu.edu/cgi-bin/xipe.cgi>) foi utilizado para as comparações não-paramétricas entre as duas bibliotecas (confiança 95% e N = 2500).

A montagem dos metagenomas foi feita utilizando-se o algoritmo de Bruijin do pacote CLC Genomics, usando os parâmetros *default*. Os *contigs* foram submetidos à anotação de sequências virais utilizando-se a plataforma automática MetaVir (Roux *et al.*, 2011).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Metagenoma não montado - Análise das *reads*

Após o pré-processamento das *reads*, a biblioteca metagenômica de *Mussismilia hispida* apresentou 368.772 *reads*, com tamanho médio de 446 pb. A biblioteca metagenômica de *Madracis decactis* apresentou 293.580 *reads*, com tamanho médio de 453 pb.

A plataforma automática de anotação de metagenomas MG-RAST realiza a classificação taxonômica e funcional das *reads* em diversas fontes de anotação, como GenBank, IMG e SEED. Nesta seção, estão descritas as classificações utilizando-se a fonte de anotação SEED (http://www.theseed.org/wiki/Main_Page), que foi a fonte que gerou maior porcentagem de anotação. Ainda assim, apenas 4,4% das *reads* de *M. hispida* e 3,3% das *reads* de *M. decactis* puderam ser anotadas.

A figura 2.1 mostra a distribuição da anotação das *reads*. A partir dessa figura, pode-se notar que a maior parte das *reads* de ambas as bibliotecas tem função desconhecida. Essa grande proporção de sequências sem similaridade com as sequências disponíveis no banco de dados é uma característica de metagenomas virais, já que os vírus são relativamente pouco estudados quando comparados às bactérias e aos eucariotos (Edwards & Rohwer, 2005).

Os vírus são as entidades biológicas mais abundantes do planeta e são encontrados em extrema abundância em ambientes aquáticos, sendo assim, a grande proporção de sequências virais nesses metagenomas poderia ser esperada. Além disso, a metodologia utilizada para a obtenção do DNA metagenômico (centrifugação para separação das partículas maiores e extração do DNA do sobrenadante) e a utilização da amplificação genômica por MDA podem ter favorecido a obtenção de moléculas de DNA pequenas, como os genomas virais (Rohwer, comunicação pessoal).

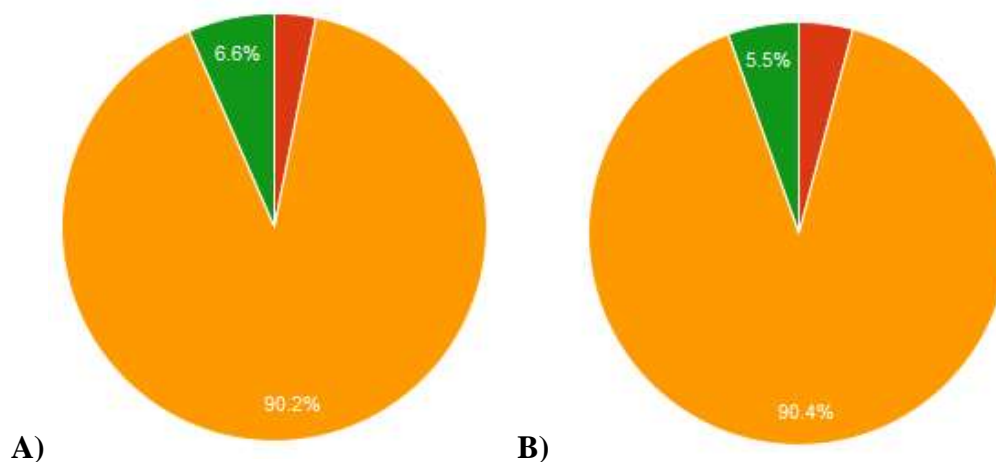


Figura 2.1. Distribuição da anotação das *reads* das bibliotecas. A) *Mussismilia hispida*; B) *Madracis decactis*. Em amarelo, encontram-se as *reads* classificadas como proteínas de função desconhecida, em verde, as *reads* que puderam ser anotadas e, em vermelho, as *reads* sem anotação.

As figuras 2.2 e 2.3 mostram a distribuição das *reads* anotadas entre os domínios de Eucariotos, Bactérias, Arqueias e Vírus. Em ambas as bibliotecas, aproximadamente 39% das *reads* foram classificadas como de vírus. A biblioteca metagenômica de *M. hispida* apresentou maior proporção de *reads* classificadas como eucariotos (30,3%) do que a biblioteca de *M. decactis* (10,3%).

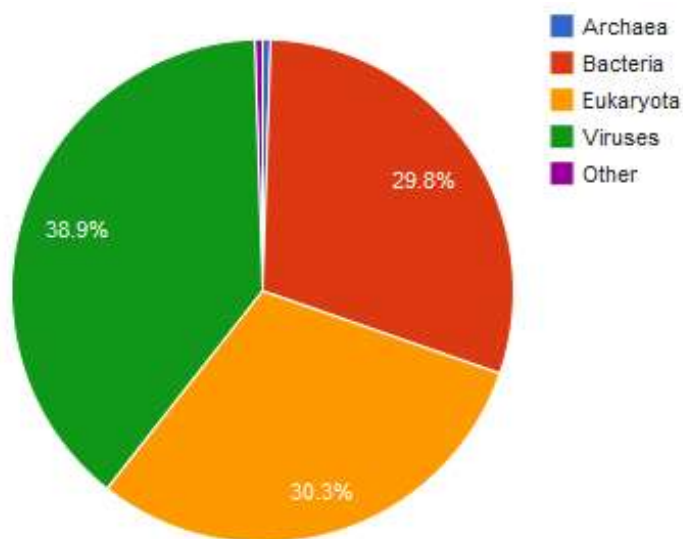


Figura 2.2. Distribuição da classificação taxonômica das *reads* anotadas de *Mussismilia hispida*.

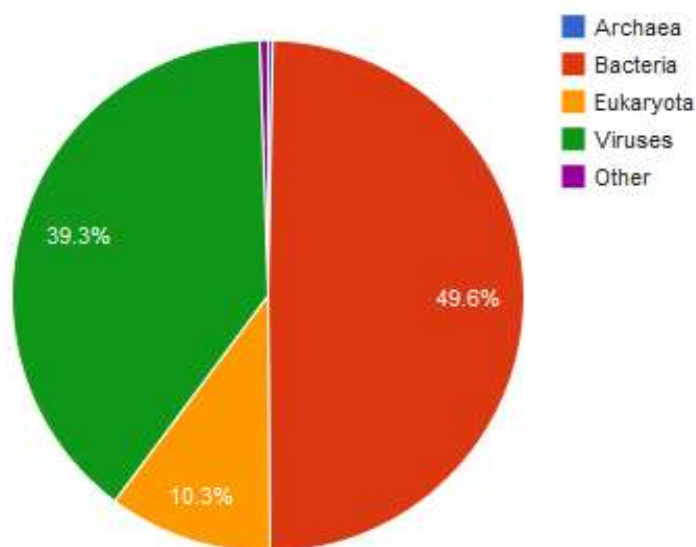


Figura 2.3. Distribuição da classificação taxonômica das *reads* anotadas de *Madracis decactis*.

A fim de se verificar se alguma Classe de organismos era mais abundante em uma espécie de coral do que em outra, foi realizado um teste não-paramétrico de reamostragem ($n = 2500$) com reposição. A tabela 2.1 mostra as Classes que diferiram significativamente entre as duas espécies de corais. A maior parte das Classes mais abundantes em *M. hispida* são de eucariotos, enquanto que as Classes mais abundantes em *M. decactis* são de bactérias. Assim sendo, as diferenças observadas nas figuras 2.2 e 2.3 parecem ser significativas. A única Classe bacteriana mais abundante em *M. hispida* foi a Classe Chlorobia. Bactérias pertencentes a essa Classe geralmente são anaeróbicas e fotoautotróficas (Li *et al.*, 2009).

Tabela 2.1. Classes com distribuição significativamente diferente entre as espécies de corais, determinadas pelo Xipe.

<i>Mussismilia hispida</i>		<i>Madracis decactis</i>	
Classe	Domínio	Classe	Domínio
Actinopterygii	Eukaryota	Actinobacteria	Bacteria
Anthozoa	Eukaryota	Alphaproteobacteria	Bacteria
Chlorobia	Bacteria	Bacilli	Bacteria
Coscinodiscophyceae	Eukaryota	Clostridia	Bacteria
Dinophyceae	Eukaryota	Demospongiae	Eukaryota
Enteropneusta	Eukaryota	Flavobacteria	Bacteria
Insecta	Eukaryota	Gammaproteobacteria	Bacteria

Mammalia	Eukaryota	Sem classificação (derivado de Cyanobacteria)	Bacteria
Sem classificação (derivado de Chordata)	Eukaryota	Sem classificação (derivado de Eukaryota)	Eukaryota
Sem classificação (derivado de Streptophyta)	Eukaryota		

Os cinco gêneros mais abundantes nas bibliotecas metagenômicas, segundo a classificação taxonômica das *reads* pelo melhor *hit* no SEED foram: *Pseudomonas*, *Tetraodon* (peixe), *Chlorobium*, T4-like vírus e *Shewanella* (Tabela 2.2).

A figura 2.4 mostra o mapeamento das *reads* do metagenoma de *M. hispida* com o genoma de *Chlorobium phaeobacteroides* BS1 em comparação ao mapeamento do mesmo metagenoma com o genoma de *Acinetobacter baumannii* AYE. Utilizando-se um e-value máximo de $1e-03$ como valor de corte, 1107 *reads* do metagenoma de *M. hispida* apresentaram similaridade com sequências do genoma de *Acinetobacter baumannii* AYE, entretanto, essas *reads* se concentram em apenas 8 regiões diferentes desse genoma, que, supostamente, codificam proteínas de replicação, de mobilização e um gene de resistência à estreptomicina. Já no o genoma de *Chlorobium phaeobacteroides* BS1, apenas 127 *reads* foram pareadas, entretanto, 94 regiões diferentes do genoma da bactéria foram representadas no metagenoma, cobrindo genes com diversas funções e apresentando em torno de 80% de identidade de nucleotídeos.

Tabela 2.2. Gêneros mais frequentes nas *reads* anotadas dos metagenomas de *M. hispida* e *M. decactis*, segundo a classificação taxonômica por SEED.

Gênero	<i>M. hispida</i> (%)	<i>M. decactis</i> (%)	Total (reads)
Sem classificação	5,34	7,32	382
<i>Pseudomonas</i>	2,21	4,09	184
<i>Tetraodon</i>	2,58	1,80	142
<i>Chlorobium</i>	3,31	0,57	140
T4-like viroses	1,29	3,39	132
<i>Shewanella</i>	1,42	1,80	98
<i>Burkholderia</i>	1,60	1,27	92
<i>Coxiella</i>	1,29	1,72	91
<i>Nitrosopumilus</i>	1,53	1,02	83
<i>Legionella</i>	0,82	1,80	75

<i>Acinetobacter</i>	1,03	1,39	73
<i>Blastopirellula</i>	1,05	1,27	71
<i>Rhodopirellula</i>	0,92	1,43	70
<i>Homo</i>	1,29	0,74	67
<i>Candidatus Protochlamydia</i>	0,53	1,88	66
<i>Synechococcus</i>	1,00	1,10	65
<i>Delftia</i>	0,87	0,94	56
<i>Polaribacter</i>	0,84	0,94	55
<i>Roseovarius</i>	0,95	0,78	55
<i>Roseobacter</i>	0,79	0,94	53
<i>Drosophila</i>	1,08	0,45	52
<i>Magnetospirillum</i>	0,76	0,94	52
<i>Vibrio</i>	0,74	0,90	50
<i>Arcobacter</i>	0,63	1,02	49
<i>Nitrosococcus</i>	0,66	0,94	48
<i>Hahella</i>	0,89	0,53	47
<i>Thioalkalivibrio</i>	0,76	0,74	47
<i>Geobacter</i>	0,79	0,61	45
<i>Rhodospirillum</i>	0,66	0,82	45
<i>Sem classificação (derivado de Gammaproteobacteria)</i>	0,05	1,76	45

Chlorobium phaeobacteroides BS1 é uma bactéria verde sulfurosa que é capaz de realizar fotossíntese anoxigênica com baixa intensidade de luz solar (Overmann *et al.*, 2002). *Prosthecochloris* sp., um gênero do filo Chlorobi, próximo ao gênero *Chlorobium*, foi a bactéria mais abundante em tecidos do coral *Oculina patagonica* no verão de 2004 (Koren & Rosenberg, 2006). Chen *et al.* (2011) encontraram um aumento da proporção de bactérias do grupo Chlorobia em *Isopora palifera* nos meses em que a disponibilidade de nitrogênio é baixa. Os autores sugerem que a habilidade de fixação de nitrogênio dessas bactérias possa compensar a deficiência de nitrogênio disponível durante esses meses. Assim sendo, sugere-se que bactérias do grupo Chlorobia poderiam colonizar os tecidos de *M. hispida* contribuindo para a fixação de nitrogênio no sistema holobionte.

Em relação à classificação funcional, pode-se ver na figura 2.5 que a maior parte das *reads*, em ambas as espécies, foram anotadas como tendo funções relacionadas a elementos transponíveis, fagos e profagos (no 1º nível hierárquico de classificação funcional). Entretanto, esse grupo

funcional foi identificado como sendo significativamente mais abundante ($p < 0,05$) em *M. hispida*.

Reads classificadas com função na fotossíntese também foram mais abundantes em *M. hispida*.

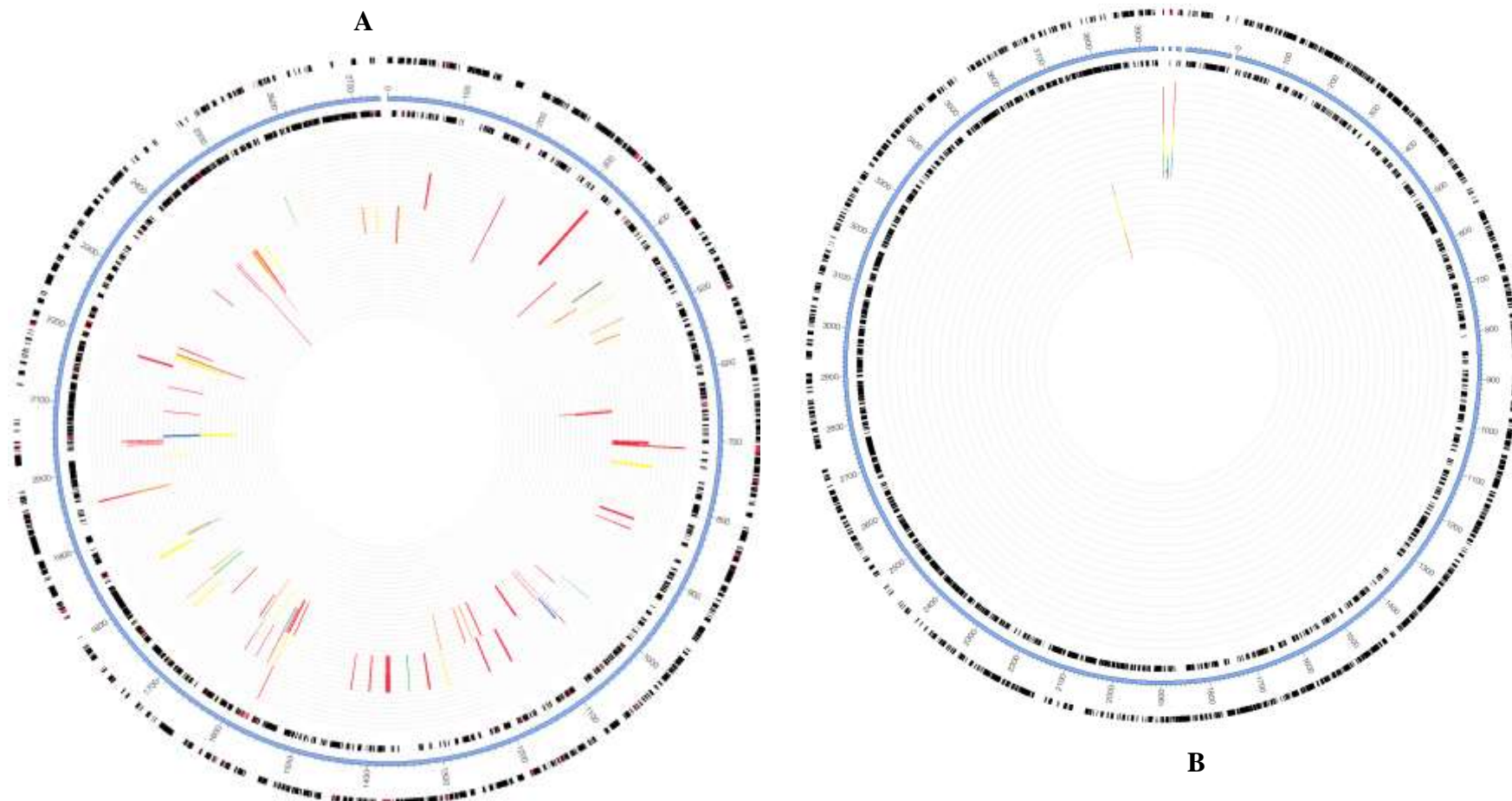


Figura 2.4. A. *Recruitment plot* das *reads* de *Mussismilia hispida* com o genoma de *Chlorobium phaeobacteroides* BS1. B. *Recruitment plot* das *reads* de *Mussismilia hispida* com o genoma de *Acinetobacter baumannii* AYE. Em azul está representado o genoma da bactéria referência. As barras coloridas representam a quantidade de *reads* que foram mapeados em uma determinada região do genoma de referência. As cores das barras representam a similaridade das *reads* com a determinada região do genoma de referência. Barras em vermelhos representam *reads* mapeadas com e-value menores que $1e-50$.

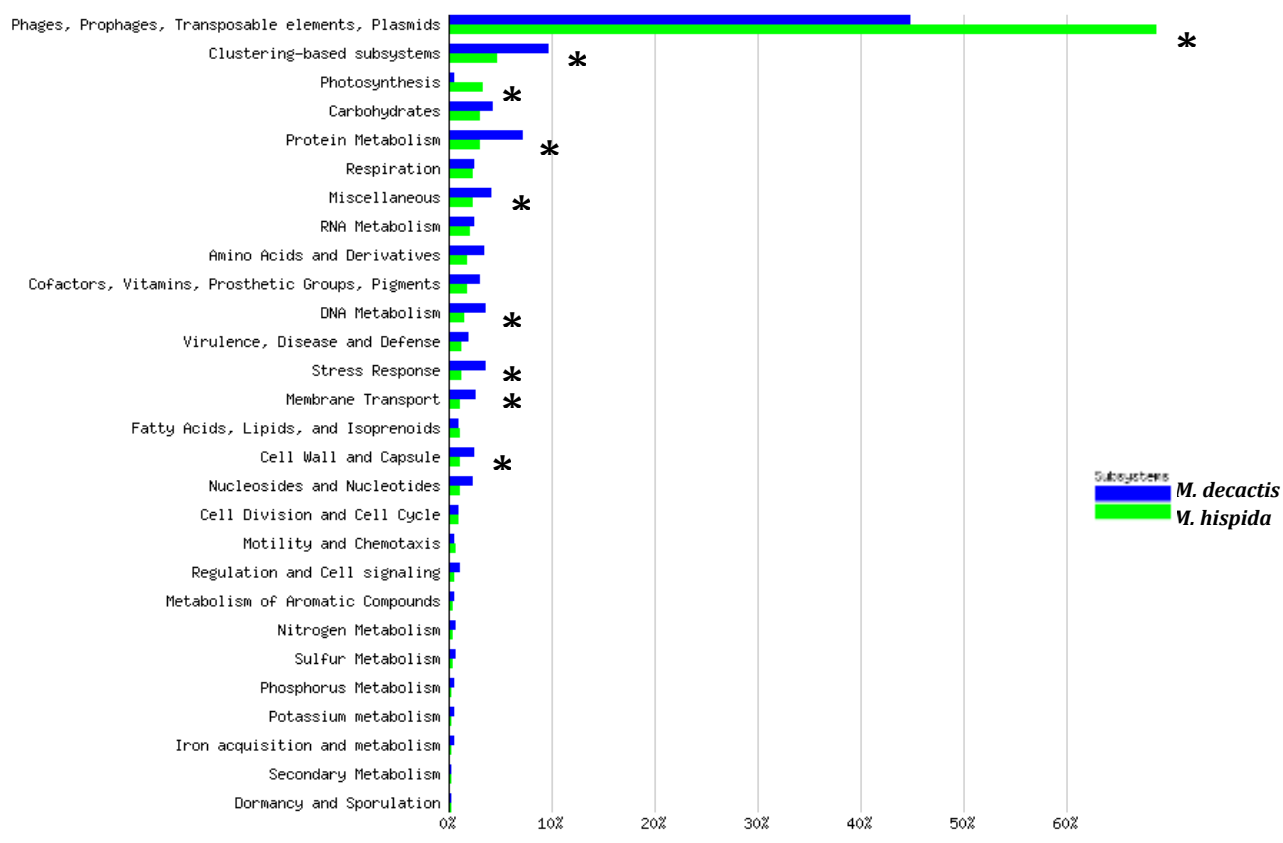


Figura 2.5. Distribuição das *reads* anotadas no 1º nível (classificação funcional SEED). As barras em verde representam os dados de *M. hispida* e as barras em azul os dados de *M. decactis*. Os subsistemas com asteriscos foram determinados pelo Xipe como significativamente diferentes entre as duas espécies.

Na tabela 2.3 estão as 20 funções mais abundantes em nos metagenoma de *M. hispida* e *M. decactis*. Pode-se perceber que a maior parte das funções está relacionada ao ciclo de vida de fagos e a elementos transponíveis (como proteína de fago, proteína de replicação, transposase) ou podem estar relacionadas, ainda, com genes mitocondriais, como citocromo c oxidase e NADH-ubiquinona oxidoreductase, o que indica um enriquecimento de genomas de fagos. Mesmo após a filtragem ainda há a presença de alguns genes de genoma mitocondrial nessas bibliotecas metagenômicas, devido ao critério de exclusão utilizado (identidade maior ou igual a 95%).

Tabela 2.3. Funções mais frequentes atribuídas às *reads* do metagenoma de *M. hispida* e *M. decactis*.

Funções SEED (Todas as reads)	<i>M. hispida</i> (%)	<i>M. decactis</i> (%)	Total
hypothetical protein	13,36	8,49	718
Phage protein	1,76	4,98	169
Ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic), alpha subunit (EC 1.17.4.1)	0,64	0,76	38
Heat shock protein 60 family chaperone GroEL	0,61	0,72	36
ATP synthase beta chain (EC 3.6.3.14)	0,70	0,13	26
Replication protein	0,30	0,49	21
photosystem II protein D2 (PsbD)	0,52	0,13	20
Transposase	0,27	0,45	19
DNA topoisomerase I (EC 5.99.1.2)	0,30	0,31	17
Cytochrome c oxidase polypeptide I (EC 1.9.3.1)	0,30	0,22	15
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase (EC 6.2.1.3)	0,21	0,31	14
ABC transporter, ATP-binding protein	0,24	0,22	13
Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)	0,30	0,13	13
IMP cyclohydrolase (EC 3.5.4.10) / Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase (EC 2.1.2.3)	0,24	0,22	13
YgjD/Kae1/Qri7 family, required for N6-threonylcarbamoyl adenosine t(6)A37 modification in tRNA	0,30	0,13	13
Cell division protein FtsH (EC 3.4.24.-)	0,24	0,18	12
DNA mismatch repair protein MutS	0,27	0,13	12
Excinuclease ABC subunit B	0,24	0,18	12
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain L (EC 1.6.5.3)	0,24	0,18	12
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain M (EC 1.6.5.3)	0,21	0,22	12

Na tabela 2.4 estão as 20 funções mais abundantes das *reads* classificadas como origem bacteriana. As funções não foram muito diferentes das observadas em todas as *reads* na tabela 2.2.

Tabela 2.4. Funções mais frequentes atribuídas às *reads* classificadas como de origem bacteriana do metagenoma de *M. hispida* e *M. decactis*.

Funções SEED (<i>Reads</i> classificadas como Bactéria)	<i>M. hispida</i> (%)	<i>M. decactis</i> (%)	Total geral
hypothetical protein	9,53	10,21	416
Heat shock protein 60 family chaperone GroEL	0,67	0,89	32
Ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic), alpha subunit (EC 1.17.4.1)	0,55	0,65	25
ATP synthase beta chain (EC 3.6.3.14)	0,82	0,18	24
hypothetical protein	0,39	0,65	21
Replication protein	0,35	0,59	19
DNA topoisomerase I (EC 5.99.1.2)	0,35	0,41	16
Transposase	0,27	0,47	15
Cytochrome c oxidase polypeptide I (EC 1.9.3.1)	0,31	0,18	11
DNA mismatch repair protein MutS	0,31	0,18	11
DNA-directed RNA polymerase beta subunit (EC 2.7.7.6)	0,31	0,18	11
Isoleucyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.5)	0,31	0,18	11
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase (EC 6.2.1.3)	0,27	0,24	11
MG(2+) CHELATASE FAMILY PROTEIN / ComM-related protein	0,35	0,12	11
YgjD/Kae1/Qri7 family, required for N6-threonylcarbamoyl adenosine t(6)A37 modification in tRNA	0,35	0,12	11
Aspartyl-tRNA(Asn) amidotransferase subunit B (EC 6.3.5.6) @ Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B (EC 6.3.5.7)	0,35	0,06	10
DNA polymerase I (EC 2.7.7.7)	0,39	0,00	10
Excinuclease ABC subunit B	0,24	0,24	10

2.3.2 Metagenômica Comparativa

Os vírus são as entidades mais abundantes nos oceanos e são o reservatório da maior parte da diversidade genética no mar (Suttle, 2007), inclusive em ambientes coralíneos. Vega-Thurber *et al.*(2008) observaram que vírus do tipo herpes são abundantes em metagenomas de corais estressados.

O estudo das comunidades virais é importante, pois alguns autores têm sugerido o seu papel na regulação de comunidades microbianas, de teias alimentares e de ciclos biogeoquímicos

(Rohwer e Thurber, 2009; Suttle, 2007; Fuhrman, 1999). Além disso, os vírus podem ser considerados um dos principais vetores de transferência horizontal de genes em ambientes naturais.

Recentemente, Modi *et al.* (2013) sugeriram que fagos são importantes reservatórios de genes de resistência a antibióticos da microbiota associada a camundongos. O estudo dos vírus associados às comunidades bacterianas pode revelar genes acessórios que podem estar sob pressão seletiva, tais genes podem ser vantajosos para as bactérias que os carregam durante a colonização do coral. Por essa razão, são transmitidos entre as bactérias desse ambiente. A fim de identificar esses genes ou funções únicas (ou mais abundantes) nas comunidades bacterianas associadas a corais, foi feita a comparação entre os metagenomas apresentados neste trabalho com metagenomas disponíveis em bancos de dados.

As distribuições de funções SEED (obtidas através da plataforma MG-RAST) e Pfam (obtidas através da plataforma Comet) dos metagenomas de *M. hispida* e *M. decactis* foram comparadas a 29 metagenomas publicamente disponíveis no MG-RAST, incluindo os metagenomas de duas espécies de corais, de intestino humano, de cécum de galinha, de invertebrados, de água do mar, de minas, de solo, de plasmidomas de rúmen bovino, de lodo de esgoto ativado, de viromas de fibrose cística e de metagenomas de água do mar (Tabela S1, Apêndice II).

A distribuição de domínios Pfam nos metagenomas de *M. hispida* e *M. decactis* foi significativamente diferente dos outros 29 metagenomas (ANOSIM-um fator, $R=0,8277$, $p=0,0069$). Os domínios Pfam significativamente mais abundantes nos metagenomas dos corais brasileiros, identificados pelo uso do teste não-paramétrico de White com 1000 replicações (White *et al.*, 2009), estão apresentados na tabela 2.5.

O gene *cvpA*, encontrado em plasmídeos, codifica uma proteína de membrana interna requerida para a produção/secreção da colicina V em *E. coli* (Fath *et al.*, 1989). Este mesmo gene, já foi encontrado no genoma de uma bactéria simbiote de afídeos (Charles *et al.*, 2011) e em

endossimbiontes de vermes-tubo (Gardebrecht *et al.*, 2012). Mutantes de *E. coli* do gene *cvpA* apresentam alterações nas propriedades do biofilme e das fímbrias curli (Hadjifrangiskou *et al.*, 2012). A família 2 de glicosiltransferases (PF1011) inclui proteínas putativas envolvidas na biossíntese da cápsula (Breton *et al.*, 2006). Glicosiltransferases são proteínas responsáveis pela síntese de polissacarídeos ou glicoproteínas (Upreti *et al.*, 2003) e estão relacionadas à colonização simbiótica de *V. fischeri* (Yip *et al.*, 2005). Brown *et al.* (2012) sugeriram que glicosiltransferases são proteínas que podem ser transferidas horizontalmente e conferem vantagem aos micro-organismos que as possuem no intestino de bovinos. Logo, tanto a proteína CvpA quanto as glicosiltransferases aparentemente estão envolvidas em diversas associações simbióticas e podem atuar na colonização bacteriana dos corais.

Tabela 2.5. Domínios Pfam significativamente mais abundantes nos metagenomas de *M. hispida* e *M. decactis*.

Domínio Pfam	Abundância Relativa	p-value	Descrição
		<0,000	
PF02674	108	1	related to colicin V production in <i>E. Coli</i> ; <i>cvpA</i> gene
PF02892	10	0,0009	BED-type zinc finger domain related to eukaryotic transposases
PF03239	33	0,0002	iron permease FTR1 family
PF07903	2	0,0006	PaRep2a protein of unknown function
PF08668	11	0,0002	involved in nucleic acid metabolism and signal transduction
PF10111	136	0,0005	glycosyltransferase-like family 2
		<0,000	domain of unknown function that seems to be involved in protein
PF11654	316	1	export

No nível 2 da classificação SEED, as diferenças observadas entre os metagenomas apresentados neste trabalho e os publicamente disponíveis também foram significativos (ANOSIM um fator, $R=0,5653$, $p=0,0328$). No nível 3 da classificação SEED, os metagenomas de *M. hispida* e *M. decactis* também foram mais similares um ao outro do que aos demais metagenomas (ANOSIM um fator, $R=0,5653$, $p=0,0285$). As categorias funcionais no nível 3 da classificação

SEED, as quais foram significativamente mais abundantes nos metagenomas dos corais brasileiros, foram identificadas usando o teste não-paramétrico de White com 1000 replicações.

A figura 2.6 mostra as vinte funções cujas as diferenças apresentaram maiores tamanho do efeito (*effect size*). Entretanto, a confirmação manual da anotação das *reads* classificadas nas categorias “*curli production*” e “*hydrogenases*” demonstrou que estas *reads* foram incorretamente anotadas e, na verdade, pertencem à categoria “*aminoglycoside adenyltransferases*”.

As adeniltransferases conferem resistência a antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, como a estreptomicina. Analisando o metagenoma montado (apresentado na próxima seção), foi possível encontrar o gene completo da *aminoglycoside-3'adenyltransferase* (786 pb), o qual aparece com sequências idênticas em ambas as espécies de corais. A sequência da proteína produto da tradução desse gene possui 95% de similaridade de aminoácidos com uma proteína hipotética de *Acinetobacter* sp. CIP 102159 e 84% de identidade com uma *streptomycin 3'-adenylyltransferase* de *Acinetobacter* sp. CIP 110321 (WP_016164849.1). Fatores relacionados à resistência a antibióticos têm sido encontrados em diversos ecossistemas, incluindo cavernas e ambientes glaciais (Bhullar *et al.*, 2012; Segawa *et al.*, 2013), demonstrando o quão facilmente esses fatores podem ser disseminados entre ambientes. Em corais, genes de resistência a fluoroquinolonas foram encontrados no metagenoma de *Porites asteroides* (Wegley *et al.*, 2007). Fatores antimicrobianos produzidos tanto pelo coral quanto pela sua microbiota podem ser responsáveis pela seleção das bactérias marinhas aptas a colonizar os tecidos dos corais (Kvennefors *et al.*, 2012). A presença de genes de resistência a aminoglicosídeos nos metagenomas de *M. hispida* e *M. decactis* podem ser resultado da disseminação global da resistência a antibióticos e/ou uma característica que confere aos micro-organismos que carregam estes genes, uma vantagem durante a colonização dos tecidos dos corais.

É interessante notar que os metagenomas de *M. hispida* e *M. decactis* apresentam poucos genes de funções metabólicas essenciais, como replicação de DNA, divisão celular e biossíntese

de aminoácidos, mas são enriquecidos de funções acessórias, como *quorum-sensing* e formação de biofilme, o que corrobora a hipótese de enriquecimento com sequências virais.

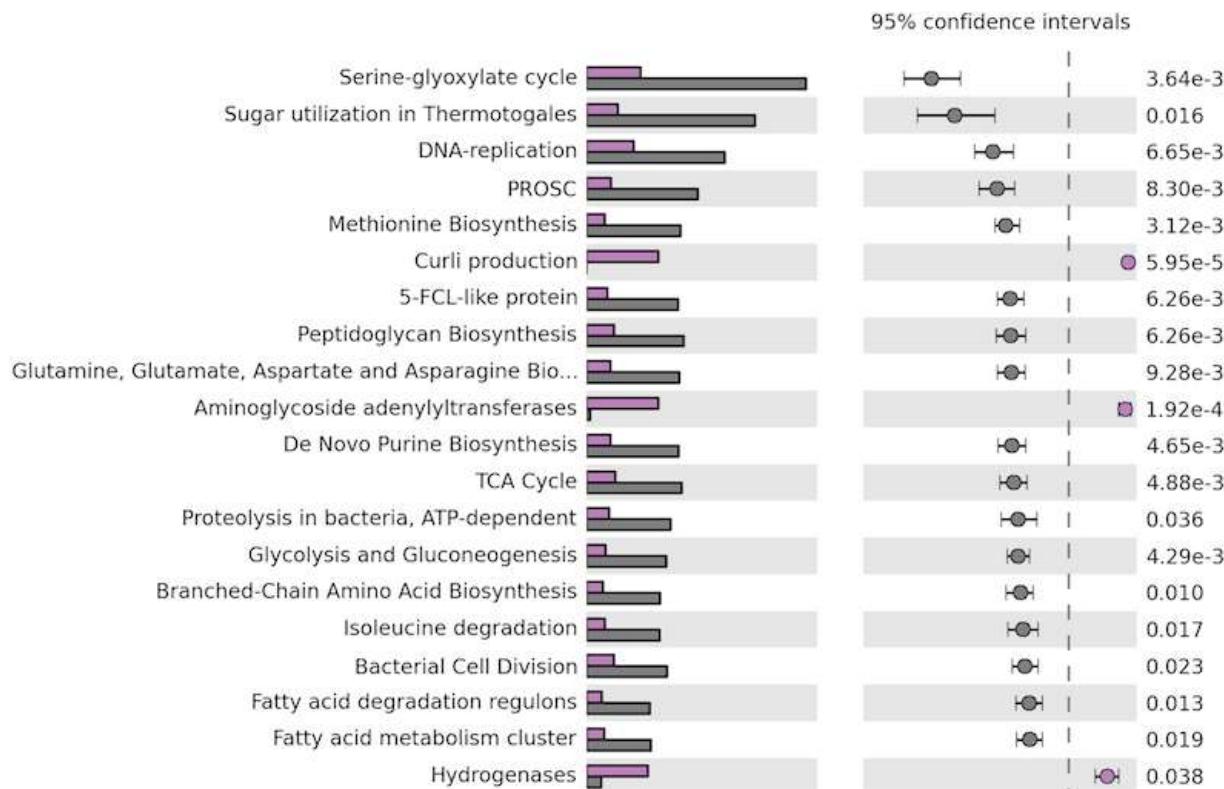


Figura 2.6. Vinte funções no nível 3 da Classificação SEED, cujas diferenças apresentaram maiores tamanho do efeito. As barras em lilás representam a abundância média entre os metagenoma de *M. hispida* e *M. decactis* e as barras cinzas a abundância média entre os demais 29 metagenomas analisados.

2.3.3 Metagenoma montado – Análise dos *contigs*

A montagem *de novo* do metagenoma de *M. hispida* gerou 8090 *contigs* com tamanho médio de 816,9 pb e um total de 6.609.044 pb. A montagem *de novo* do metagenoma de *M. decactis* gerou 5286 *contigs* com tamanho médio de 937,7 pb e um total de 5.003.652 pb.

Os *contigs* foram anotados na plataforma MetaVir, uma plataforma específica para anotação de *contigs* de metagenomas virais. 507 *contigs* do metagenoma de *M. hispida* foram classificados como de origem viral, enquanto que 582 *contigs* de *M. decactis* foram classificados como virais.

As figuras 2.7 e 2.8 mostram a distribuição taxonômica dos *contigs* virais de *M. hispida* e *M. decactis*, respectivamente. Em *M. decactis* 407 (70%) *contigs* foram classificados como sendo de vírus de DNA simples fita (ssDNA) e 156 (27%) *contigs* foram classificados como sendo de vírus de DNA dupla fita (dsDNA). Já em *M. hispida*, 264 (52%) *contigs* foram classificados como sendo de vírus ssDNA e 212 (42%) *contigs* foram classificados como sendo de vírus dsDNA. Muitos desses vírus não possuem hospedeiro conhecido e são geralmente encontrados em metaviromas marinhos. Entretanto, destaca-se a presença de cianofagos que infectam bactérias dos gêneros *Synechococcus* e *Prochlorococcus*. Marhaver *et al.* (2008) sugerem que a presença de cianofagos no sistema holobionte de corais pode afetar a estrutura das populações das cianobactérias simbiotes e endolíticas. Os fagos são responsáveis por, pelo menos, 50% das mortes bacterianas no oceano (Wilcox & Fuhrman, 1994), mas podem ser responsáveis por uma porcentagem ainda maior do coral holobionte, já que a mobilidade de protistas predadores de bactérias pode ser mais restrita no muco e nos tecidos dos corais. Dessa forma, a infecção de grupos bacterianos específicos por fagos pode controlar a diversidade dos micro-organismos associados aos corais (Marhaver *et al.*, 2008).

Figura 2.7. Composição taxonômica de vírus entre os *contigs* de *M. hispida*.

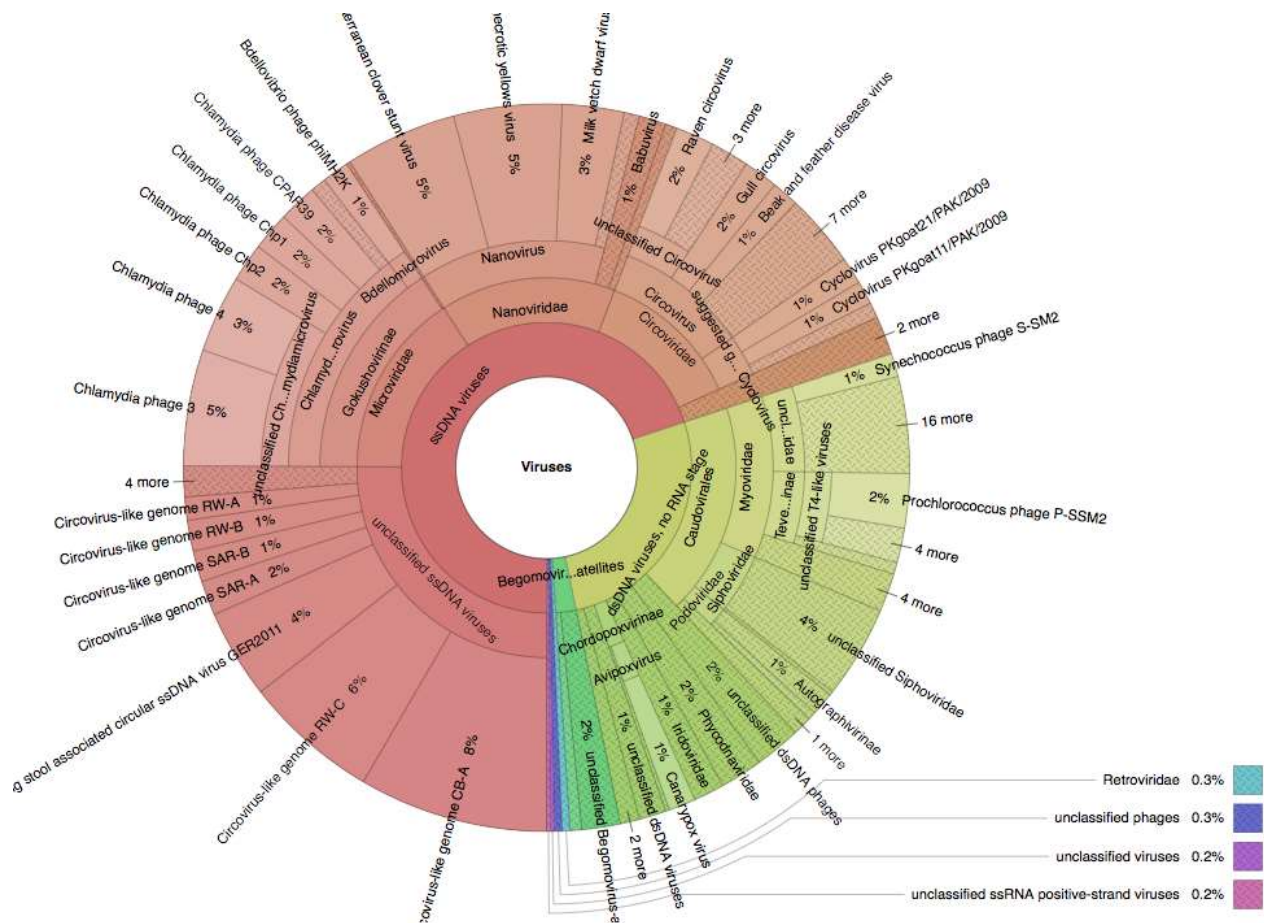


Figura 2.8. Composição taxonômica de vírus entre os *contigs* de *M. decactis*.

No MetaVir, também foi realizada uma comparação da composição de tetranucleotídeos dos *contigs* de *M. hispida* e *M. decactis* a *contigs* de outros metagenomas disponíveis. Os metagenomas utilizados na análise provêm de corais submetidos a diversos estresses ambientais e de água do mar de diversos recifes de corais. A figura 2.9 mostra o dendrograma obtido nesta análise, bem como pode-se observar que os metagenomas de *M. hispida* e *M. decactis* são mais próximos ao metagenoma do coral *Porites compressa* na condição controle, em relação à composição de tetranucleotídeos, do que aos metagenomas de corais estressados ou de água do mar.

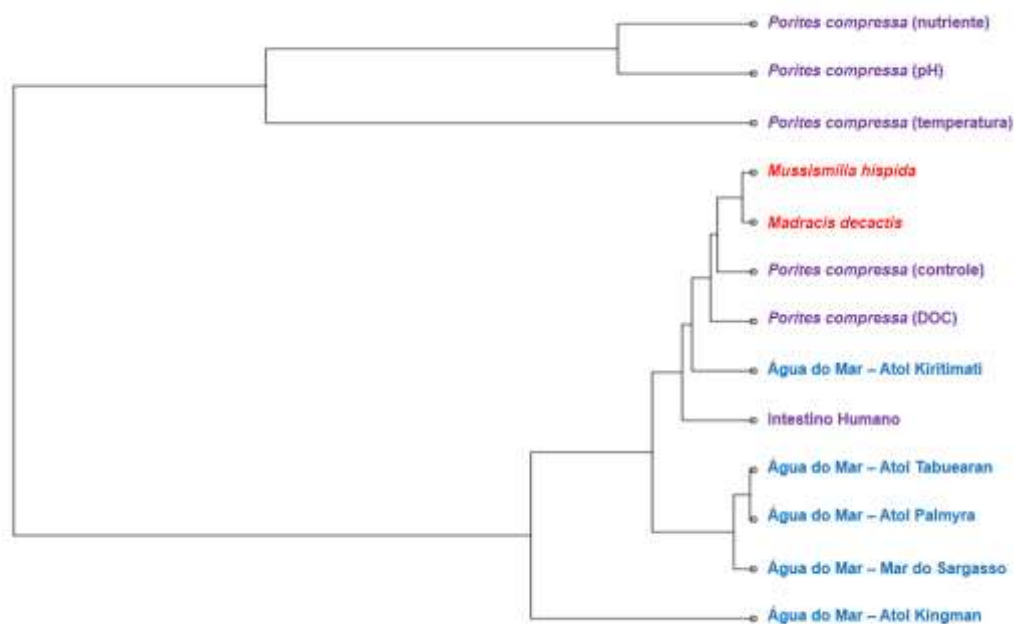


Figura 2.9. Dendrograma construído a partir da composição de tetranucleotídeos dos *contigs* de diversos metagenomas. Em azul estão metagenomas de água do entorno de recifes de corais. Em roxo estão metagenomas de corais e um metagenoma humano submetidos a diferentes estresses ambientais. Em vermelho estão os metagenomas de *M. hispida* e de *M. decactis*.

O *contig* 1947 (8324 pb) de *M. hispida* apresentou um único hit no blastn de 99% de identidade de nucleotídeos e 100% de cobertura de alinhamento a uma região do genoma de *Delftia acidovorans* SPH-1. Esse *contig* foi classificado pelo MetaVir como sendo da família Inoviridae, à qual pertencem os fagos filamentosos. A figura 2.10 mostra as ORFs encontradas no *contig* 1947, e a tabela 2.6 mostra a anotação dessas ORFs segundo o MetaVir.

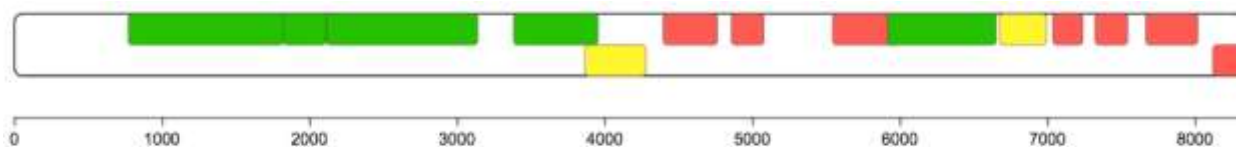


Figura 2.10. ORFs encontradas no *contig* 1947 de *M. hispida*. Em verde, estão os genes que puderam ser anotados com o banco de referências RefSeq, utilizado pelo MetaVir. Em amarelo, estão os genes não anotados que apresentaram similaridade com algum domínio Pfam. Em vermelhos, estão os genes que não puderam ser anotados e nem apresentaram similaridade com nenhum domínio Pfam.

Tabela 2.6. Anotação das ORFs encontradas no *contig* 1947 de *M. hispida* utilizando os bancos RefSeq e Pfam como referência.

Gene	Blast	Hmmscan
gene_1	YP_863927.1 / Viruses ssDNA viruses Inoviridae Inovirus unclassified Inovirus Ralstonia phage RSS1 / hypothetical protein / 50.4	PF05616.8 / Neisseria_TspB / 66.1
gene_2	YP_863928.1 / Viruses ssDNA viruses Inoviridae Inovirus unclassified Inovirus Ralstonia phage RSS1 / putative minor coat protein / 50.8	PF10734.4 / DUF2523 / 86.9
gene_3	YP_863929.1 / Viruses ssDNA viruses Inoviridae Inovirus unclassified Inovirus Ralstonia phage RSS1 / hypothetical protein / 230	PF05707.7 / Zot / 112.6
gene_4	YP_002290965.1 / Viruses ssDNA viruses Inoviridae Inovirus unclassified Inovirus Ralstonia phage RSM3 / hypothetical protein / 157	PF00239.16 / Resolvase / 138.7
gene_5	- / - / hypothetical protein / -	PB000114 / Pfam-B_114 / 32.2
gene_6	- / - / hypothetical protein / -	- / - / -
gene_7	- / - / hypothetical protein / -	- / - / -
gene_8	- / - / hypothetical protein / -	- / - / -
gene_9	YP_004327588.1 / Viruses ssDNA viruses Inoviridae unclassified Inoviridae Ralstonia phage PE226 / putative phage DNA replicase / 87.4	PF02486.14 / Rep_trans / 129.2
gene_10	- / - / hypothetical protein / -	PB001844 / Pfam-B_1844 / 122.2
gene_11	- / - / hypothetical protein / -	- / - / -
gene_12	- / - / hypothetical protein / -	- / - / -
gene_13	- / - / hypothetical protein / -	- / - / -
gene_14-partial	- / - / hypothetical protein / -	- / - / -

O conteúdo GC do genoma de *D. acidovorans* SPH-1 é de 66% e da região com identidade ao *contig* 1947 é de 55%, essa diferença no conteúdo GC pode indicar que essa região represente a inserção de um genoma de fago (Akhter *et al.*, 2012).

Fagos filamentosos são vírus ssDNA que infectam células bacterianas e são secretados sem matar seu hospedeiro e, muitas vezes, se integram ao cromossomo bacteriano utilizando recombinases do hospedeiro (Bobay *et al.*, 2013). Apesar de não matar, a infecção por fagos filamentosos, diversas vezes, pode diminuir a aptidão da célula hospedeira (Webster, 2001). Entretanto, em alguns casos a infecção pode acentuar ou aumentar a virulência do hospedeiro,

como em *Ralstonia solanacearum*, neste foi observado que a infecção pelo fago RSS1 no fitopatógeno aumenta a produção de proteínas relacionadas à virulência. Em *Pseudomonas aeruginosa*, o fago filamentoso Pf4 está relacionado ao aumento da virulência e às alterações no biofilme (Rice *et al.*, 2009). O mais estudado dos fagos filamentosos, o CTXphi de *Vibrio cholerae* carrega o gene para a toxina colérica, o principal gene de virulência responsável pela diarreia maciça (Davis *et al.*, 2000).

Parte do *contig* 1947 de *M. hispida* possui arranjo e tamanho de genes semelhante ao de outros fagos filamentosos, como o CTXphi, a ORF1 (gene_1), a ORF2 (gene_2) e a ORF3 (gene_3) (Figura 2.11). Entretanto, as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos têm baixa homologia entre os diferentes fagos.

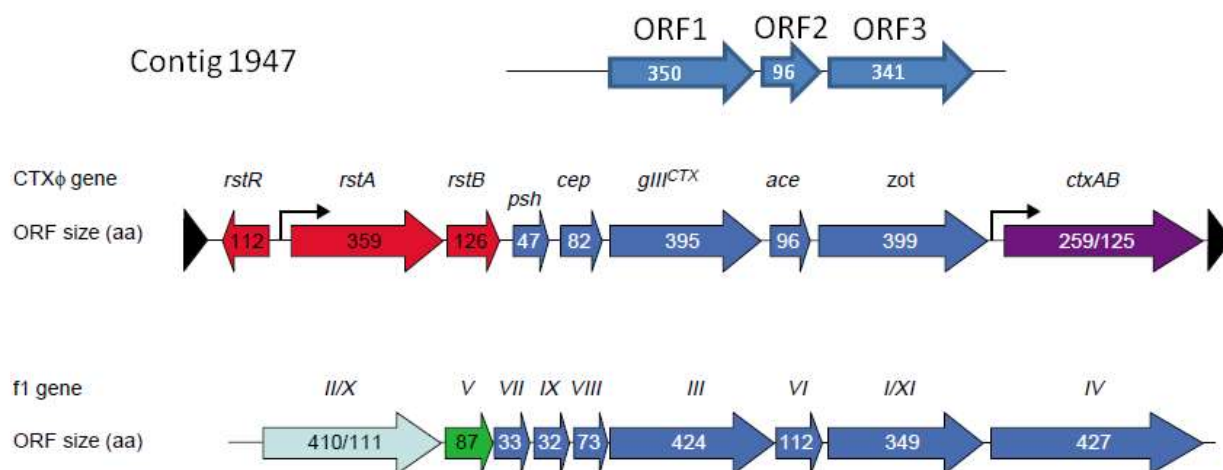


Figura 2.11. Comparação do genoma de fagos filamentosos à região inicial do *contig* 1947 de *Mussismilia hispida*.

Assim como a ORF3 do *contig* 1947, outras duas ORFs do metagenoma de *M. hispida* foram anotadas como *zot*, gene que codifica a proteína *zonula occludens toxin*: a primeira delas é a ORF do *contig* 4482 e a segunda é a ORF do *contig* 4085. Enquanto que a sequência de proteína *zot* do *contig* 1947 apresenta 100% de identidade com a *zot* de *Delftia acidovorans* SPH-1 (YP_001563122), a sequência do *contig* 4482 apresentou identidade máxima de 31% com a *zot* de *Methyloversatilis universalis* FAM5 (ZP_08506639) e a sequência do *contig* 4085 apresentou

identidade máxima de 41% com a *zot* de *Pseudomonas stutzeri* RCH2 (YP_007240361). Ao passo que três ORFs do metagenoma de *M. hispida* foram anotadas como *zot*, nenhuma foi encontrada em *M. decactis*, o que pode indicar que esta seja uma função específica do sistema holobionte de *M. hispida*.

Foi realizada uma busca pela sequência de aminoácidos da ORF3 do *contig* 1947 por blastp em mais de 1300 metagenomas do banco de dados IMG (<http://img.jgi.doe.gov/>). Onze sequências apresentaram e-value menor que 1-e50 e *score* maior que 250. Essas sequências foram de metagenomas do sedimento do lago Washington em Seattle (Project Id: Gm00201); de amostras de placa gengival de humanos (Project Id: Gm00341); de comunidades associadas à cianobactéria *Trichodesmium* no Pacífico (Project ID: Gm00387); de comunidades de sedimento do estuário do Rio Oak nos EUA (Project Id: Gm00321); e de comunidades do solo de floresta tropical em Porto Rico que decompõe *Panicum virgatum* (Project Id: Gm00278). Portanto, apesar de sequências homólogas à ORF3 do *contig* 1947 terem sido encontradas em diversos tipos de ambientes em todo o planeta, essa não é uma sequência comum, pois foi encontrada em apenas 11 de 1338 metagenomas.

O fago filamentoso, já caracterizado, mais próximo ao profago hipotético de *D. acidovorans* é o RSS1 de *Ralstonia solanacearum* (ambas as bactérias hospedeiras pertencem à Classe Betaproteobacteria). Addy *et al.* (2012) observaram um aumento da produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) e da motilidade de células infectadas com esse fago. Além disso, os fagos filamentosos são montados na superfície celular e muitas das partículas destes acabam se acumulando na membrana da bactéria, o que pode alterar sua hidrofobicidade. Todas essas características poderiam auxiliar a bactéria infectada pelo fago durante a colonização do macro-organismo hospedeiro.

Nos resultados anteriores, apresentados no Capítulo 1, foi encontrada uma maior proporção de OTUs de Betaproteobacteria no muco dos corais escleractíneos (*Madracis*, *Mussismilia* e *Tubastraea*) do que nas demais amostras, demonstrando que bactérias pertencentes a este grupo, assim como a *D. acidovorans*, compõem a microbiota comensal dos corais escleractíneos. Destarte, o profago hipotético de *D. acidovorans* SPH-1, encontrado no metagenoma de *M. hispida*, pode estar relacionado com a habilidade dessa bactéria em colonizar os tecidos do coral.

2.4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste capítulo evidenciam a importância dos vírus na microbiota dos corais, podendo estes desempenhar dois papéis principais: 1) participação modulação da e manutenção da homeostase da microbiota, pois, geralmente, os vírus infectam bactérias específicas e podem levar à lise celular ou às alterações na aptidão do hospedeiro e podem, também, atuar como agentes infecciosos do próprio coral ou da alga endossimbionte. 2) participação em eventos de THG, transferindo genes que podem ser importantes para a sobrevivência e competição de bactérias neste ambiente, como por exemplo, genes de resistência a antibióticos.

2.5 REFERÊNCIAS

- Addy HS, *et al.* (2012) The filamentous phage ϕ RSS1 enhances virulence of phytopathogenic *Ralstonia solanacearum* on tomato. *Phytopathology* 102: 244–251.
- Akhter S, *et al.* (2012) PhiSpy: a novel algorithm for finding prophages in bacterial genomes that combines similarity- and composition-based strategies. *Nucl Acids Res* 1-13.

- Bobay LM, *et al.* (2013) The Adaptation of Temperate Bacteriophages to Their Host Genomes. *Mol Biol Evol.* [Epub ahead of print]
- Breton C (2006) Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology* 16, 29-37.
- Brown Kav A, *et al.* (2012) Insights into the bovine rumen plasmidome. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 5452-5457.
- Bhullar K, *et al.* (2012) Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLOS One* 7, e34953.
- Burke C, *et al.* (2001) Bacterial community assembly based on functional genes rather than species. *PNAS* 108: 1488-1493.
- Cárdenas A, *et al.* (2012) Shifts in bacterial communities of two Caribbean reef-building coral species affected by white plague disease. *ISME J* 6,502-512.
- Carlos C, *et al.* (2013) Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species. *Sci Rep* 3:1624.
- Charles H, *et al.* (2011) A genomic reappraisal of symbiotic function in the aphid/Buchnera symbiosis: reduced transporter sets and variable membrane organisations. *PLOS One* 6, e29096.
- Chen C-P, *et al.* (2011) The dynamics of microbial partnerships in the coral *Isopora palifera*. *ISMEJ* 5(4): 728–740.
- Davis BM, *et al.* (2000) CTX prophages in classical biotype *Vibrio cholerae*: functional phage genes but dysfunctional phage genomes. *J Bacteriol* 182, 6992-8.
- Edwards RA & Rohwer F (2005) Viral metagenomics. *Nat Rev Microbiol* 3, 304-310.
- Fath MJ, *et al.* (1989) Characterization of a *purF* operon mutation which affects colicin V production. *J Bacteriol* 171, 3158-3161.

- Fuhrmann JA (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* 399, 541-548.
- Fukami H & Knowlton N (2005) Analysis of complete mitochondrial DNA sequences of three members of the *Montastraea annularis* coral species complex (Cnidaria, Anthozoa, Scleractinia). *Coral Reefs* 24:410–417.
- Garcia GD, *et al.* (2013) Metagenomic analysis of healthy and white plague-affected *Mussismilia braziliensis* corals. *Microb Ecol* 65,1076-1086.
- Gardebrecht A, *et al.* (2012) Physiological homogeneity among the endosymbionts of *Riftia pachytila* and *Tevnia jerichonana* revealed by proteogenomics. *ISME J* 6, 766-776.
- Hadjiifrangiskou M, *et al.* (2012) Transposon mutagenesis identifies uropathogenic *Escherichia coli* biofilm factors. *J Bacteriol* 194, 6195-6205.
- Haen K, *et al.* (2010) Parallel loss of nuclear-encoded mitochondrial aminoacyl- tRNA synthetases and mtDNA-encoded tRNAs in Cnidaria. *Mol Biol Evol* 27:2216–2219.
- Hellberg ME (2006) No variation and low synonymous substitution rates in coral mtDNA despite high nuclear variation. *BMC Evol Biol* 6:24–32
- Kvennefors EC, *et al.* (2012) Regulation of bacterial communities through antimicrobial activity by the coral holobiont. *Microb Ecol* 63, 605-618.
- Koren O & Rosenberg E (2008) Bacteria associated with the bleached and cave coral *Oculina patagonica*. *Microbiol. Ecol.* 55, 523-529 .
- Li H, *et al.* (2009). Multiple antioxidant proteins protect *Chlorobaculum tepidum* against oxygen and reactive oxygen species. *Arch. Microbiol.* 191, 853–867.
- Lingner T, *et al.* (2011) CoMet - a web server for comparative functional profiling of metagenomes. *Nucleic Acids Res* 39, W518-523.

- Meron D, *et al.* (2012) Changes in coral microbial communities in response to a natural pH gradient. *ISME J* 6, 1775-1785
- Modi SR, *et al.* (2013) Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature* 499, 219-222.
- Meyer F, *et al.* (2008) The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 9, 386.
- Overmann J & Schubert K. (2002) Phototrophic consortia: model systems for symbiotic interrelations between prokaryotes. *Arch Microbiol.* 177(3):201-8.
- Rice SA, *et al.* (2009) The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *ISMEJ* 3:271–282.
- Rodriguez-Lanetty M, *et al.* (2013) Ecological inferences from a deep screening of the Complex Bacterial Consortia associated with the coral *Porites astreoides*. *Mol Ecol* 22, 4349-4362.
- Rohwer F & Thurber RV (2009) Viruses manipulate the marine environment. *Nature* 459, 207-212.
- Roux S, *et al.* (2011) Metavir: a web server dedicated to virome analysis. *Bioinformatics* 27 (21), 3074-3075
- Schmieder R, *et al.* (2011) Identification and removal of ribosomal RNA sequences from metatranscriptomes. *Bioinformatics* 28 (3), 433-435
- Schmieder R, *et al.* (2011) TagCleaner: Identification and removal of tag sequences from genomic and metagenomic datasets. *BMC bioinformatics* 11 (1), 341
- Segawa T, *et al.* (2013) Distribution of antibiotic resistance genes in glacier environments. *Environ Microbiol Rep* 5, 127134.
- Sharp KH, *et al.* (2012) Diversity and dynamics of bacterial communities in early life stages of the Caribbean coral *Porites astreoides*. *ISME J* 6, 790-801.

- Suttle CA (2007) Marine viruses — major players in the global ecosystem. *Nat Rev Microbiol* 5, 801-812.
- Upreti RK, *et al.* (2003) Bacterial glycoproteins: functions, biosynthesis and applications. *Proteomics* 3, 363-379.
- Vega Thurber RL, *et al.* (2008) Metagenomic analysis indicates that stressors induce production of herpes-like viruses in the coral *Porites compressa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 18413-8.
- Vega Thurber R, *et al.* (2009) Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. *Environ Microbiol* 11, 2148-2163.
- Webster R (2001) Filamentous phage biology. In Phage Barbas CF, Burton DR, Scott JK and Silverman (eds) *Phage Display: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Wegley L, *et al.* (2007) Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. *Environ Microbiol* 9, 2707-2719.
- Witt V, *et al.* (2011) Effect of substrate type on bacterial community composition in biofilms from the Great Barrier Reef. *FEMS Microbiol Lett* 323, 188-195.
- White JR, *et al.* (2009) Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples. *PLOS Comput Biol* 5, e1000352.
- Yip ES, *et al.* (2005) A novel conserved cluster of genes promotes symbiotic colonization and sigma-dependent biofilm formation by *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol* 57, 1485-1498.
- Yokouchi H, *et al.* (2006) Whole-metagenome amplification of a microbial community associated with scleractinian coral by multiple displacement amplification using phi29 polymerase. *Environ Microbiol* 8, 1155-1163.

CAPÍTULO 3

Análise de genômica comparativa com *Paracoccus* sp.

**SM22M-07 isolado de muco de coral: novas revelações
sobre as interações coral-bactéria**

3.1 INTRODUÇÃO

Os principais objetivos da microbiologia de corais são: entender o papel da microbiota de corais e entender como as associações coral-bactéria são estabelecidas e mantidas. A comunidade bacteriana associada aos corais compreende à porção mais diversa e complexa do coral holobionte, dessa forma, muitos estudos têm se concentrado em abordagens independentes de cultivo para avaliar o repertório funcional dessa comunidade (Garcia *et al.*, 2013; Vega Thurber *et al.*, 2009; Wegley *et al.*, 2007; Yokouchi *et al.*, 2006). Entretanto, o sequenciamento do metagenoma da microbiota de corais tem se mostrado desafiador, principalmente devido à dificuldade em se obter apenas DNA bacteriano do sistema coral holobionte em quantidade e qualidade suficiente. Geralmente, os metagenomas de corais são enriquecidos com sequências de *Symbiodinium*, mitocôndria e do próprio hospedeiro (Wegley *et al.*, 2007), o que impede uma avaliação profunda e não enviesada do potencial funcional da comunidade microbiana. Em contrapartida, estudos do perfil taxonômico dessa comunidade, a partir do sequenciamento do rDNA 16S, são comuns e bem sucedidos na determinação da estrutura e composição dessa microbiota (Carlos *et al.*, 2013; Rodriguez-Lanetty *et al.*, 2013; Cárdenas *et al.*, 2012; Sharp *et al.*, 2012; Meron *et al.*, 2012; Witt *et al.*, 2011). A partir desses estudos, diversos grupos bacterianos têm sido repetidamente encontrados associados aos corais, como o grupo dos Oceanospirillales, dos *Pseudoalteromonas* spp., dos *Vibrio* spp. e dos *Paracoccus* spp..

O gênero *Paracoccus* pertence à família Rhodobacteraceae e à Classe Alphaproteobacteria e compreende 34 espécies reconhecidas, caracterizadas por serem Gram-negativa, com morfologia de cocos e crescimento aeróbico em uma ampla variedade de substratos (Kelly *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2013).

Paracoccus denitrificans foi a primeira espécie do gênero a ser descrita (Beijerinck & Minkman, 1910) e é um organismo modelo no estudo de citocromos e de mecanismos de transferência de elétrons, devido à similaridade com algumas características mitocondriais (John & Whatley, 1975). Do mesmo modo, *P. denitrificans* tem sido estudada devido às suas habilidades de desnitrificação, metilotrofia e seu potencial de aplicação em processos de biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Baumann *et al.*, 1996; Stouthamer, 1992, Teng *et al.*, 2010). Essa espécie foi a primeira representante do gênero a ter seu genoma sequenciado. O genoma de *P. denitrificans* apresenta dois cromossomos e um plasmídeo, apresentando genes relacionados à desnitrificação e a diversos genes que codificam citocromos. Além disso, tal genoma possui genes que conferem resistência a diversos compostos, como à acriflavina, ao arsênico e ao telúrio (Siddavattam *et al.*, 2011).

Paracoccus é um gênero de bactérias com metabolismo versátil, as quais são encontradas em diversos ambientes, como solo (Dastager *et al.*, 2011), água do mar (Kham *et al.*, 2008), lodo de esgoto ativado (Sun *et al.*, 2013) ou mina de carvão (Siddavattam *et al.*, 2011); tal gênero também tem sido encontrado em associação a macro-organismos, como na rizosfera de *Crossostephium chinense* (Kämpfer *et al.*, 2012), nos briozoários marinhos (Pukall *et al.*, 2003) e nos corais (Sheu *et al.*, 2011).

Em um estudo da comunidade bacteriana associada ao coral *Mussismilia braziliensis*, Reis *et al.* (2009) observaram a dominância de uma OTU classificada como *Paracoccus* sp., em amostras de muco de colônias saudáveis. Godwin *et al.* (2012) também observaram *Paracoccus* spp. associados às colônias saudáveis do coral *Turbinaria mesenterina*. No trabalho descrito no Capítulo 1, OTUs classificadas no gênero *Paracoccus* foram aproximadamente 3,8 vezes mais abundantes nas amostras de muco de coral do que no ambiente de entorno (água do mar e

sedimento) (Carlos *et al.*, 2013). Todos esses estudos indicam que membros do gênero *Paracoccus* compõem a microbiota comensal de corais.

Neste trabalho, é apresentada a versão inicial do genoma de *Paracoccus* sp. SM22M-07, isolado do muco do coral *Mussismilia hispida*. A partir de análises comparativas, foram identificadas características únicas deste genoma e, também, características que podem desempenhar um papel no estabelecimento e na manutenção da associação bactéria-coral. Esta é a primeira descrição do genoma de uma bactéria pertencente à microbiota comensal de corais.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Isolamento da linhagem bacteriana e do DNA

O muco de *M. hispida* foi obtido como descrito por Carlos *et al.*, (2013) em Janeiro de 2012, no Canal de São Sebastiao, Ilhabela, São Paulo (S 23°51'467 W 45°25'867). A temperatura da superfície do mar foi registrada em 28°C e os corais estavam a uma profundidade de 11 metros. O muco foi transportado no gelo até o laboratório do CBMEG/Unicamp, onde foi inoculado em meio ao GASWA (*Glycerol Artificial Seawater Agar*) (Smith & Hayasaka 1982), a temperatura ambiente, por um período de 2-5 dias. Micro-organismos que exibiram morfologia de colônia única (em comparação a outras colônias da mesma placa) foram selecionados para a purificação a partir de estriamento em placas de GASWA, que foram mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Os isolados bacterianos foram preservados em água do mar artificial com 15% de glicerol e mantidos a -80°C.

Os isolados bacterianos purificados foram identificados a partir do sequenciamento do fragmento entre as regiões V3 e V6 do rDNA 16S. Os *primers* de PCR usados foram o 338F

(ACTCCTACGGGAGGCAGCAG) e o 1046R (CGACAGCCATGCANACCT) (Huse *et al.*, 2008). As reações de amplificação (volume final 50µL) foram realizadas diretamente de uma colônia isolada e foram compostas por 1U de Taq (Fementas), por tampão de reação 1X (Fermentas), por 2mM de MgCl₂, por 200µM de cada dNTP e por 0,4µM de cada *primer*. As amplificações foram realizadas como se segue: desnaturação inicial 94°C por 5 min, 35 ciclos a 94°C por 1 min – 60°C por 1 min – 72°C por 3 min. A extensão final foi a 72°C por 20 min. Os produtos de PCR foram purificados, utilizando o *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare) e a qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose. Os produtos de PCR foram submetidos ao sequenciamento e a identificação foi feita nos bancos de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>). A classificação em gênero foi feita utilizando-se um *threshold* de identidade maior ou igual a 80%.

O DNA utilizado no sequenciamento do genoma foi isolado utilizando-se o kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega) seguindo as instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose e a quantificação foi feita por espectrofotômetro.

3.2.2 Sequenciamento, montagem e anotação do genoma

Uma biblioteca *paired-end* (2x100 pb, tamanho do inserto 400 pb) do genoma de *Paracoccus* sp. SM22M-07 foi sequenciada utilizando a plataforma Illumina HiSeq2000 do Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Utilizando-se o NGS QC Toolkit v.2.2.3 (Petel & Jain, 2012) foram triadas as *reads*, com pelo menos 70 bases, com qualidade mínima de 20. A montagem foi feita pelo software Edena v3. (Hernandez *et al.*, 2013), que resultou em 83 *contigs*

com tamanho mínimo de 1000 pb e pelo software SSPACE v2.0 (Boetzer *et al.*, 2011), o qual foi usado para gerar os 65 *scaffolds*.

O genoma foi anotado com o servidor RAST usando o algoritmo GLIMMER para a predição de ORFs. As sequências codificantes de proteínas (*pegs*) também foram submetidas à anotação em categorias COG usando RPSBLAST 2.2.15, NCBI COG 1.0 *prokaryotic proteins database* (atualizado em 3/21/2013) com um e-value máximo de 0,001.

Possíveis regiões de inserção de profagos foram identificadas na sequência de *contigs* concatenados com a plataforma PHAST (<http://phast.wishartlab.com/>) (Zhou *et al.*, 2011).

3.2.3 Determinação de ortólogos e análise de pangenoma

O pangenoma do gênero *Paracoccus* foi determinado com o genoma do isolado SM22M-07 com mais quatro genomas de representantes do gênero, disponíveis publicamente no IMG (<http://img.jgi.doe.gov/er/>): *Paracoccus denitrificans* PD1222 (Project ID: Gc00472); *Paracoccus* sp. N5 (Project ID: Gi13958); *Paracoccus* sp. J55 (Project ID: Gi0020002); *Paracoccus zeaxanthinifaciens* ATCC 21588 (Project ID: Gi21330) e um genoma disponível no NCBI: *Paracoccus aminophilus* JCM 7686 (Project ID: 10803). Foi utilizado o algoritmo OrhtoMCL presente no pacote *get_homologues.pl*, utilizando uma cobertura de alinhamento mínima de 75% e um e-value máximo de 1e-05.

3.2.4 Análise filogenética da sequência do gene 16S rDNA

A sequência completa do gene rDNA 16S de bactérias tipo do gênero *Paracoccus* foi obtida no banco de dados do RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>) e foi alinhada utilizando o algoritmo

ClustalW. A análise filogenética foi feita utilizando o software Mega 5.2, (Tamura *et al.*, 2011) através do método da Máxima Verossimilhança, com o modelo Tamura 3-parâmetros e com 1000 replicações de *bootstrapping*.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Características genômicas e classificação de SM22M-07

O rascunho do genoma de *Paracoccus* sp. SM22M-07 apresentou um tamanho de 3,9 Mb, com cobertura média de 710 vezes, conteúdo GC médio de 60%, 3078 *pegs* anotadas em categorias COG (Tabela 3.1) e 3934 *pegs* anotadas em subsistemas SEED. O genoma possui 47 sequências de tRNAs e 3 sequências de rRNAs.

Tabela 3.1. Classificação em categorias COG dos genes codificantes de proteínas no genoma de *Paracoccus* sp. SM22M-07.

Classe COG	Total	Porcentagem	Descrição
B	2	0.07	Chromatin structure and dynamics
C	212	6.89	Energy production and conversion
D	35	1.14	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
E	353	11.47	Amino acid transport and metabolism
F	84	2.73	Nucleotide transport and metabolism
G	279	9.06	Carbohydrate transport and metabolism
H	137	4.45	Coenzyme transport and metabolism
I	140	4.55	Lipid transport and metabolism
J	162	5.26	Translation, ribosomal structure and biogenesis
K	219	7.12	Transcription
L	168	5.46	Replication, recombination and repair
M	188	6.11	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
N	40	1.3	Cell motility
O	117	3.8	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
P	191	6.21	Inorganic ion transport and metabolism
Q	106	3.44	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
R	407	13.22	General function prediction only
S	318	10.33	Function unknown
T	152	4.94	Signal transduction mechanisms
U	66	2.14	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
V	34	1.10	Defense mechanisms

A sequência do gene de 16S rRNA de SM22M-07 foi comparada a outras trinta sequências de linhagens tipo de espécies do gênero *Paracoccus*. SM22M-07 apresentou maior similaridade (98% de identidade e alinhamento de 1413 pb) ao *Paracoccus seriniphilus*, uma bactéria isolada do briozoário marinho *Bugula plumosa*. A análise filogenética do gene 16S rDNA revelou que o isolado de muco de *M. hispida* encontra-se no mesmo ramo de *Paracoccus* spp. produtores de astaxantina (Figura 3.1). Entretanto, SM22M-07 forma colônias cor creme, indicando que não produz o carotenoide laranja, astaxantina. Ao mesmo tempo, não foram encontrados em seu genoma os genes de ketolases, os quais estão envolvidos na biossíntese do pigmento.

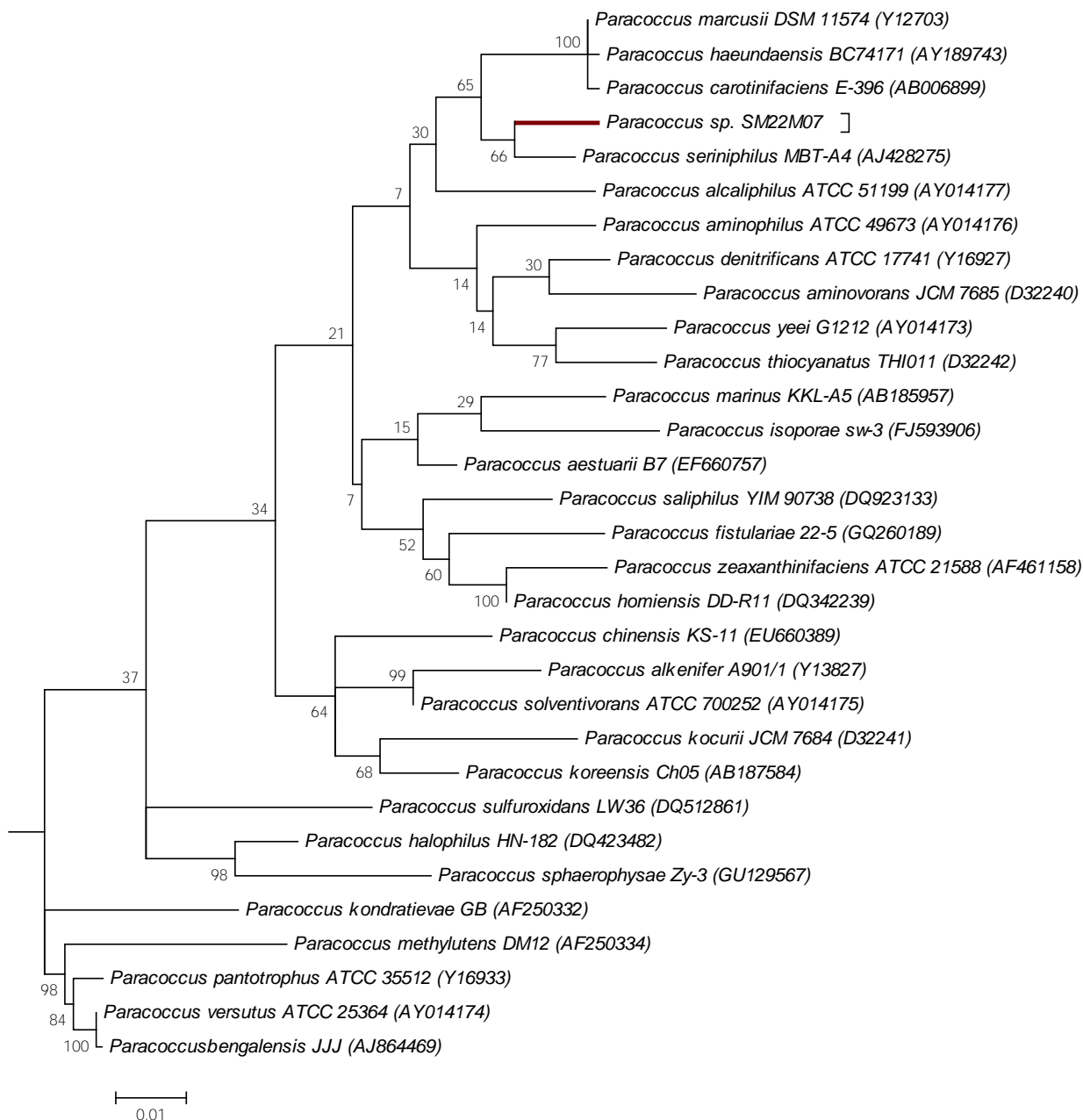


Figura 3.1. A análise filogenética foi realizada pelo software Mega 5.2 com Máxima Verossimilhança e o modelo de Tamura 3-parâmetros com *bootstrapping* com 1000 replicações. As sequências completas do gene completo do 16S rRNA foram alinhadas ao algoritmo ClustalW.

A análise do genoma de *Paracoccus* sp. SM22M-07 revelou a presença de genes que codificam proteínas relacionadas à utilização de uma enorme variedade de fontes de carbono, incluindo o álcool eritritol, o qual não é catabolizado pela maioria dos representantes de *Paracoccus*. Além disso, foram encontrados genes envolvidos na amonificação, na assimilação de

fósforo inorgânico, na oxidação de enxofre, proteínas flagelares, na tolerância a cobre e em outros metais pesados, em mecanismos de tolerância ao estresse osmótico, além de diversas transposases e integrases e todos os quinze genes relacionados à formação de partículas típicas de Rhodobacterales que se assemelham a fagos e são chamadas *Gene Transfer Agents* (GTA), indicando uma grande versatilidade metabólica e uma alta capacidade de adaptação a diversos ambientes.

3.3.2 Análise de pan- e core-genoma

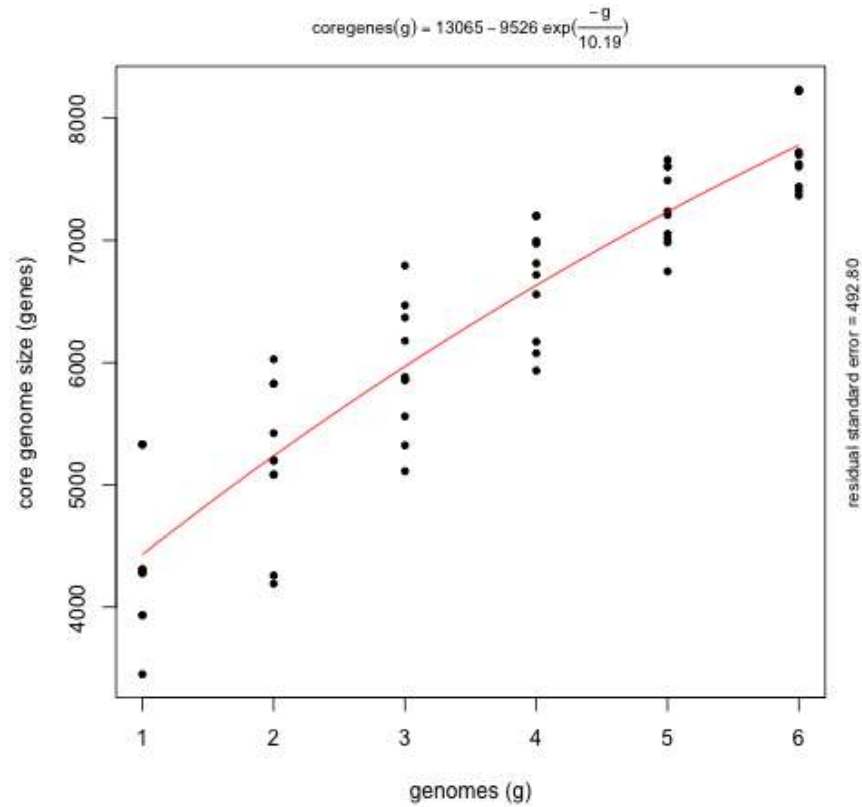
Um total de 4584 grupos de ortólogos foram detectados nos seis genomas de membros analisados do gênero *Paracoccus* representando assim o pan-genoma do gênero, sendo que 1593 são compartilhados entre os seis genomas, ou seja, formam o provável genoma *core* do gênero *Paracoccus* (Figura 3.2). Fazem parte desse *core*-genoma genes relacionados a funções metabólicas essenciais, como metabolismo energético, divisão celular, replicação de DNA, transcrição e síntese de proteínas, além de genes que codificam proteínas flagelares, que participam do metabolismo de nitrogênio, do armazenamento de poliésteres alifáticos, de estresse oxidativo, entre outros.

Tabela 3.2. Valores de similaridade Jaccard de composição de grupos de homólogos entre os seis genomas analisados do gênero *Paracoccus*.

	<i>Paracoccus</i> <i>sp.</i> N5	<i>P. denitrificans</i>	<i>Paracoccus</i> <i>sp.</i> J55	<i>P. zeaxanthinifaciens</i>	<i>P. aminophilus</i>
<i>Paracoccus sp.</i> SM22M-07	0,58601	0,5509	0,557934	0,764975	0,545847
<i>Paracoccus sp.</i> N5	1	0,701158	0,736432	0,538009	0,593107
<i>P. denitrificans</i>	-	1	0,799241	0,511258	0,564897
<i>Paracoccus sp.</i> J55	-	-	1	0,536894	0,556574
<i>P. zeaxanthinifaciens</i>	-	-	-	1	0,546691
<i>P. aminophilus</i>	-	-	-	-	1

Um dendrograma foi construído usando a similaridade de composição de grupos calculada com o índice de Jaccard (Tabela 3.2 e Figura 3.3). O genoma de *Paracoccus* sp. SM22M-07 compartilha mais homólogos com *Paracoccus zeaxanthinifaciens*, uma bactéria isolada de água do mar, e menos com *Paracoccus aminophilus*, uma bactéria isolada de solo contaminado por solventes orgânicos (Tabela 3.2). Na figura 3.3 é possível identificar um ramo formado pelos isolados marinhos do gênero *Paracoccus* e um ramo formado pelos isolados de solo.

a)



b)

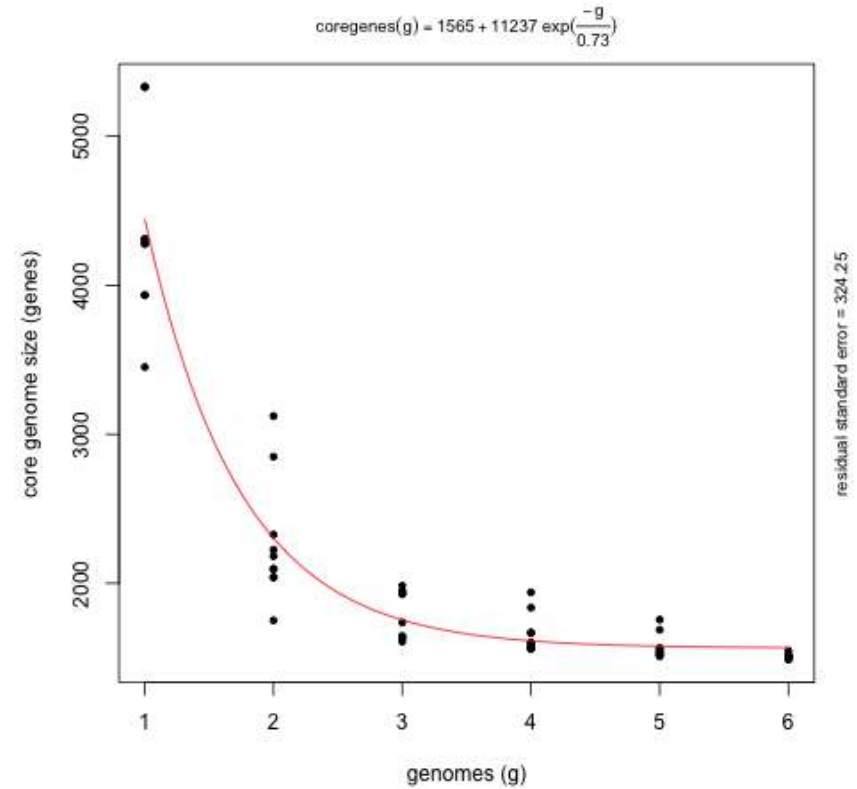


Figura 3.2. Pan-genoma (a) e core genoma (b) do gênero *Paracoccus*. O número de grupos de genes foram plotados em função do número de genomas sequencialmente adicionados. Os círculos são os valores obtidos para diferentes combinações de genomas dadas por $g!/(g-i)!i!$, em que, g representa o número de genomas comparados e i o número total de genomas. A curva contínua em vermelho é a linha de tendência.

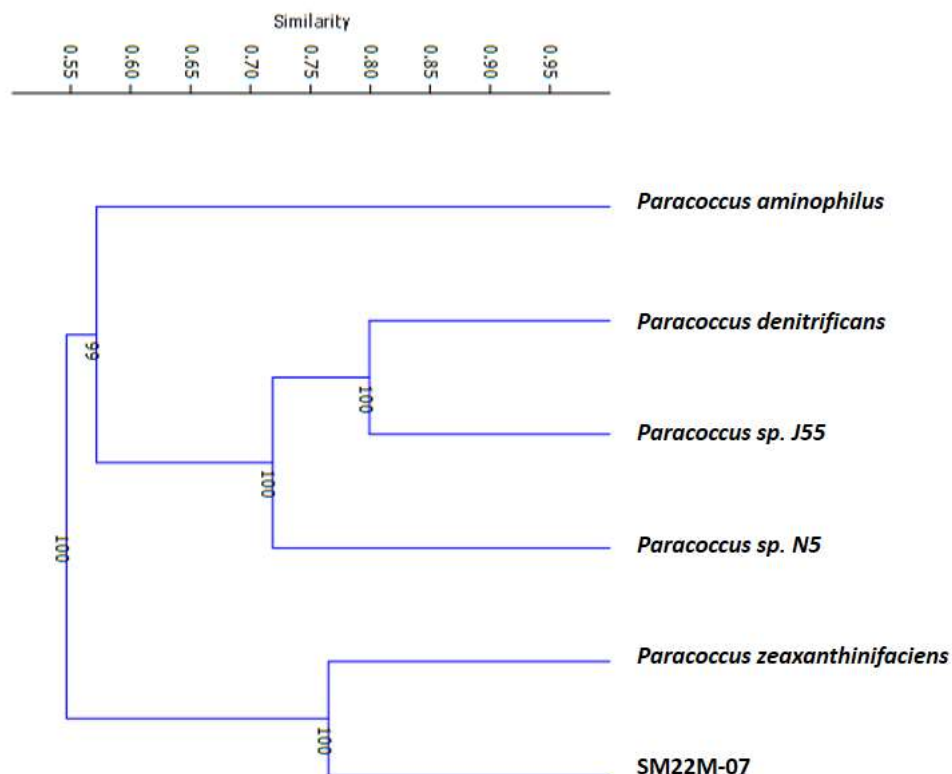


Figura 3.3. Dendrograma UPGMA de similaridade Jaccard da composição de grupos de homólogos entre seis genomas do gênero *Paracoccus*.

Os genomas de SM22M-07 e *P. zeaxanthinifaciens* compartilham 267 grupos de proteínas que não são encontrados nos demais genomas analisados. Dentre elas, podemos citar diversas famílias de proteínas relacionadas ao transporte transmembrana, como transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), proteínas do sistema de transporte tipo TRAP (*tripartite ATP-independent periplasmic*), *antiporters* de íons sódio, transportadores de potássio, transportadores de açúcares e aminoácidos específicos, incluindo osmólitos, além de transportadores de biopolímeros. Outros homólogos exclusivos dessas duas espécies estão relacionados à transdução de sinais, como proteínas sensores histidina-quinase, metiltransferases relacionadas à quimiotaxia, uma redutase de mercúrio, e a alguns reguladores de transcrição, além de proteínas de função desconhecida.

É possível notar que muitos dos fatores únicos dos genomas das bactérias marinhas compreendem proteínas de membrana. Proteínas integrais de membrana desempenham um papel

fundamental na interação com o ambiente, permitindo o influxo e efluxo de íons e moléculas e a veiculação de informações sobre as condições ambientais para a célula (Patel *et al.*, 2010). Portanto, pode-se esperar que bactérias que habitam o mesmo ambiente possuam proteínas de membranas mais semelhantes entre si do que com bactérias de ambientes diferentes.

Estudos têm observado a grande abundância de proteínas de transporte em metagenomas marinhos, especialmente do tipo ABC e do tipo TRAP (Poretsky *et al.*, 2010; Sowell *et al.*, 2011) e acredita-se que tais proteínas estejam envolvidas no processamento do carbono orgânico dissolvido (COD). Dessa forma, a presença de genes que codificam essas proteínas nos genomas dos representantes marinhos do gênero *Paracoccus* demonstra a existência de adaptações nicho-específicas dentro do gênero.

Foram encontrados 225 genes presentes, apenas, no genoma do isolado SM22M-07 e não nos genomas dos demais representantes do gênero *Paracoccus*. Alguns desses genes e suas funções serão apresentados e discutidos nas próximas seções.

3.3.3 Profagos

Muitos fagos podem desenvolver uma relação simbiótica com seus hospedeiros, o que é denominado lisogenia (Ackermann e Dubow, 1987). Tal fenômeno geralmente envolve a integração do genoma do fago (denominado profago) ao genoma do hospedeiro. Tais infecções virais silenciosas podem ser passadas para as células filhas e podem ser ativadas ou induzidas por fatores ambientais ainda mal compreendidos, o que provoca a lise do hospedeiro.

A principal vantagem de lisogenia sob a perspectiva de um fago é a capacidade de sobreviver a períodos de baixa abundância do hospedeiro. No entanto, as vantagens para o hospedeiro são, provavelmente, mais sutis, já que a posse de DNA extra pode ter um custo

metabólico. Além disso, um profago pode também ser considerado uma bomba molecular perigosa, que, muitas vezes, resulta na lise do hospedeiro. Entretanto, alguns genes no profago podem aumentar a aptidão do hospedeiro, chamados de fatores de aptidão, através de diversos mecanismos, por exemplo, servindo como ponto de ancoragem para rearranjos genéticos e silenciando genes não essenciais do hospedeiro (Paul, 2008).

Foram identificadas 6 prováveis regiões de profagos no genoma de SM22M-07 (Tabela 3.3). Entretanto, apenas as regiões 1 e 2 são flanqueadas por regiões *attL*, que indicam eventos de integração do genoma do fago ao genoma da bactéria hospedeira.

Tabela 3.3. Prováveis profagos inseridos no genoma de *Paracoccus* sp. SM22M-07 identificados com o programa PHAST. *Score* máximo = 150.

REGION	REGION LENGTH	SCORE	CDS	REGION POSITION	POSSIBLE PHAGE	GC %
<u>1</u>	18Kb	90	25	<u>168792-186832</u>	PHAGE_Azospi_Cd_NC_010355	61.03%
<u>2</u>	42.3Kb	90	36	<u>529373-571769</u>	PHAGE_Rhodob_RcapNL_NC_020489	63.74%
<u>3</u>	26.3Kb	70	20	<u>2705579-2731925</u>	PHAGE_Azospi_Cd_NC_010355	64.79%
<u>4</u>	14.3Kb	80	17	<u>2849598-2863962</u>	PHAGE_Roseob_1_NC_015466	65.36%
<u>5</u>	5.6Kb	70	12	<u>3078866-3084554</u>	PHAGE_Enterob_BP_4795_NC_004813	61.93%
<u>6</u>	13.2Kb	70	16	<u>3474831-3488059</u>	PHAGE_Enterob_Sf6_NC_005344	55.55%

A figura 3.4 mostra a organização das ORFs encontradas no possível profago 1 e a figura 3.5 no possível profago 2. Pode-se observar que em ambas as regiões foram encontradas ORFs que codificam integrases e proteínas de capsídeo viral. A região 1 apresentou semelhança ao fago Cd de *Azospirillum braziliensis*, um fago dsDNA pertencente à família Siphoviridae (Boyer *et al.*, 2008). E a região 2 apresentou semelhança ao fago RcapNL, também dsDNA, mas sem taxonomia definida.

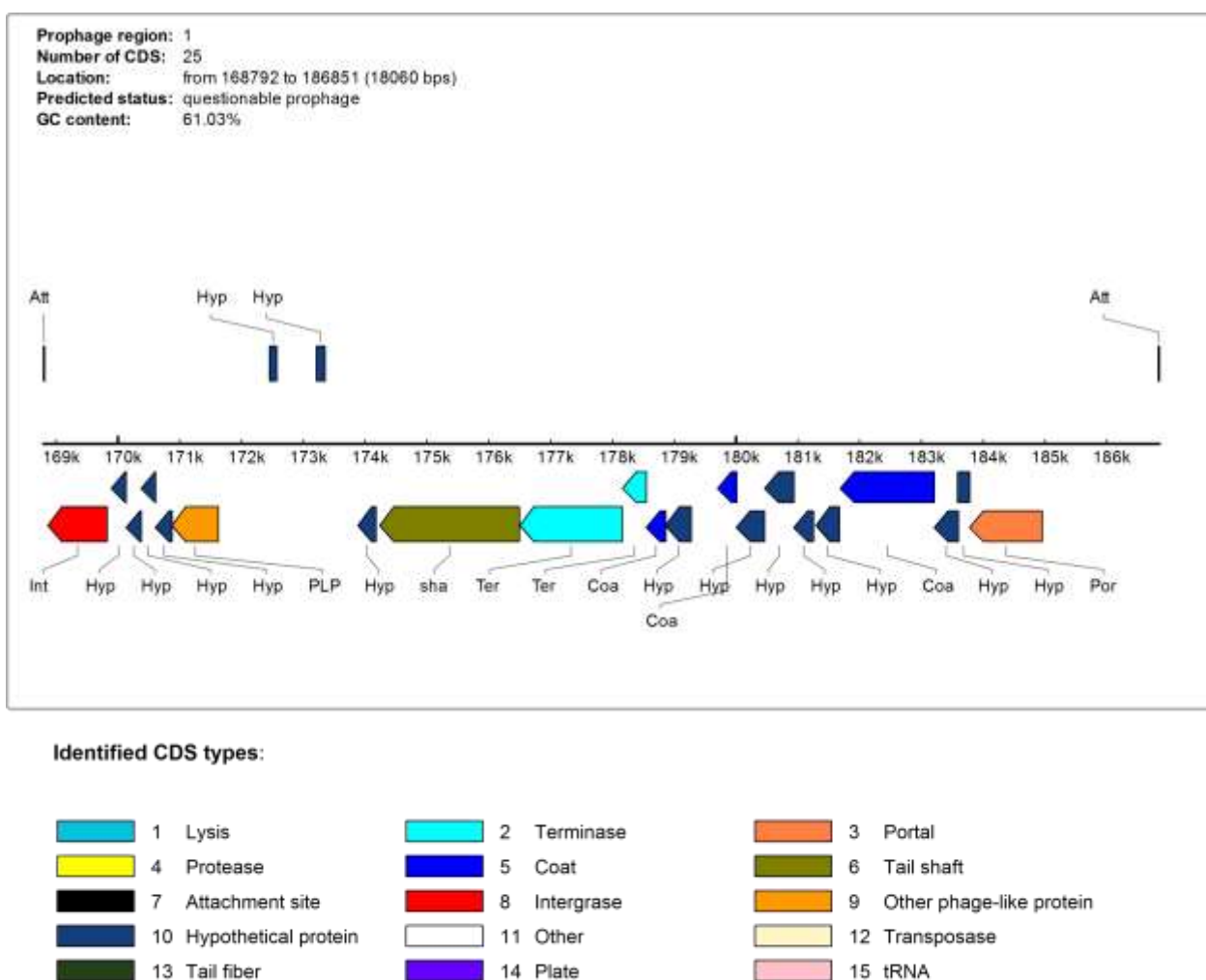


Figura 3.4. Representação das ORFs encontradas no possível profago encontrado região 1 do genoma de *Paracoccus* sp. SM22M-07. Figura gerada automaticamente pelo programa PHAST.

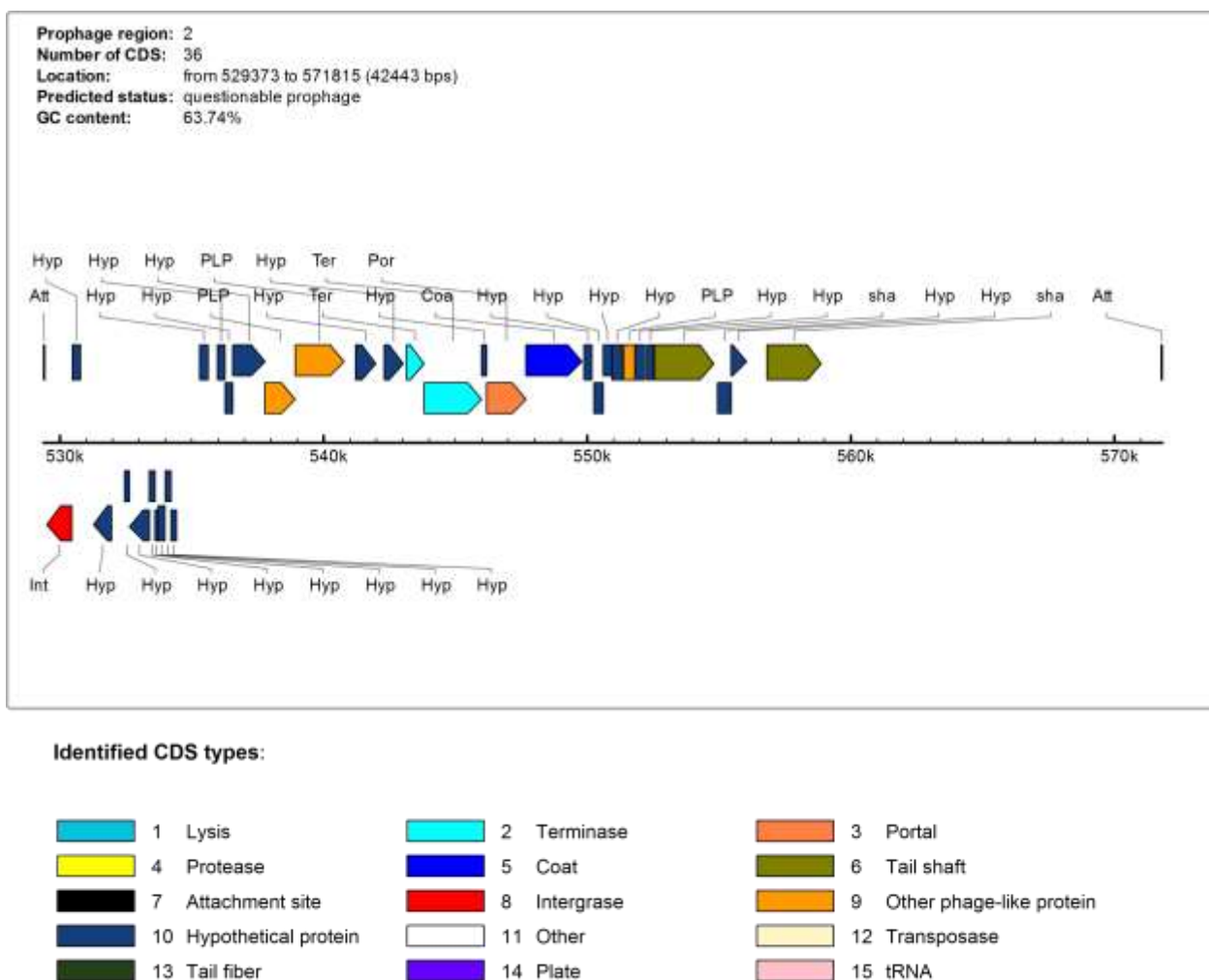


Figura 3.5. Representação das ORFs encontradas no possível profago encontrado região 2 do genoma de *Paracoccus* sp. SM22M-07. Figura gerada automaticamente pelo programa PHAST.

Em nenhuma das regiões foi encontrada qualquer ORF de origem bacteriana com função predita. É difícil prever se esses profagos teriam efeitos positivos ou negativos na aptidão de SM22M-07. Segundo Paul (2008), metade das bactérias marinhas cultiváveis contém sequências de profagos inseridas no genoma. Estudos de diversos ambientes marinhos indicam que ambientes com alta produtividade primária são dominados por infecções de fagos líticos, enquanto que ambientes oligotróficos, com baixa tensão de oxigênio ou submetidos a estresses sazonais, favorecem a lisogenia (Paul, 2008). Dessa forma, a ocorrência de pelo menos dois profagos

putativos no genoma de SM22M-07 poderia ser explicada devido ao ambiente em que essa bactéria foi isolada, o qual é suscetível a diversos estresses ambientais, como poluição e temperatura.

3.3.4 Sistema de secreção do tipo II e tipo IV

Os sistemas de secreção de proteínas desempenham um papel central na modulação das interações bactéria-hospedeiro. Muitas das proteínas secretadas (toxinas e proteínas efetoras) por simbioses e bactérias patogênicas têm a capacidade de entrar no interior das células hospedeiras e modificar sua fisiologia facilitando e promovendo a colonização (Tseng *et al.*, 2009). Em bactérias Gram-negativas, nas quais a secreção envolve a translocação através das membranas interna e externa, estão descritos seis tipos de sistema de secreção.

O sistema de secreção tipo II (T2SS) é encontrado em diversas bactérias Gram-negativas e parece desempenhar funções específicas que promovem a interação de bactérias com seu ambiente, seja ele biótico ou abiótico (Cianciotto, 2005). Foi encontrada em *Paracoccus* sp. SM22M-07 uma região genômica contendo doze genes que codificam proteínas que fazem parte do sistema de secreção do tipo II, tais genes não foram encontrados nos demais genomas de *Paracoccus* analisados. Esse sistema de secreção tipo II (T2SS) tem sido encontrado super-representado em metagenomas de ambientes aquáticos e da microbiota associado a um molusco (Barret *et al.*, 2012).

O sistema de secreção tipo IV (T4SS) é o único capaz de transportar ácidos nucleicos, e proteínas para o interior de células de plantas, animais, leveduras e outras bactérias (Christie & Cassales, 2005). Genes do T4SS correspondem a importantes determinantes de virulência em muitas bactérias Gram-negativas, como *Agrobacterium tumefaciens*, *Bartonella henselae*, *Bordetella pertussis*, *Brucella* spp., *Helicobacter pylori* e *Legionella pneumophila* (Cascales & Christie 2003).

Em SM22M-07 foram encontrados os genes que codificam as proteínas VirB2, VirB3, VirB4, VirB6, VirB8, VirB9, VirB10, VirB11, VirD4, VirD2 e VirC1, bem como o gene de uma transglicosilase lítica, todos esses genes citados participam da formação do T4SS. O sistema T4SS melhor caracterizado é o de *Agrobacterium tumefaciens*, o qual é capaz de translocar um plasmídeo Ti à célula do hospedeiro e levar um crescimento tumoral à planta. Os componentes principais do T4SS de *A. tumefaciens* são as proteínas VirB2-VirB11 e VirD4. A proteína VirB1 tem atividade de transglicosilase lítica e é responsável por remodelar o peptidoglicano, as demais proteínas são responsáveis por formar a estrutura da maquinaria secretória, que consome energia via hidrólise do ATP (Christie & Cassales, 2005). O T4SS tem sido encontrado super-representado, principalmente, em metagenomas associados a artrópodes, mas, também, nas microbiotas de mamíferos e pássaros (Barret *et al.*, 2012).

A ausência desses sistemas de secreção nos demais genomas analisados de *Paracoccus* pode indicar que eles estejam envolvidos em funções únicas, desempenhadas pelo isolado de muco de coral SM22M-07. Entretanto, experimentos são necessários para confirmar a atividade desses sistemas e determinar quais os seus papéis no estabelecimento de interações com corais.

3.3.5 Metabolismo de carboidratos

Foram encontrados genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo de diversos carboidratos, como na utilização de amino-açúcares - quitina e N-acetilglucosamina; di e oligossacarídeos - galactose, lactose, sucrose, maltose e maltodextrina; ácidos orgânicos - lactato; polissacarídeos - glicogênio; monossacarídeos - manose, frutose, D-ribose, entre outros- e açúcares álcoois - glicerol, inositol, manitol e eritritol. A capacidade de utilizar o eritritol como única fonte de carbono não é universal entre as bactérias (Jordan, 1984; Stowers, 1985), há evidências que

sugerem que os genes responsáveis pelo catabolismo de eritritol (*eryABCD*) podem ser transferidos horizontalmente (Yost *et al.*, 2006). Além disso, também são necessários os genes *eryEFG* que codificam três transportadores ABC, um regulador do tipo DeoR, uma triose fosfato isomerase e uma ribulose fosfato isomerase (Yost *et al.*, 2006). Todos esses genes foram encontrados no genoma de SM22M-07 e também no genoma do isolado *Paracoccus* sp. N5. A figura 3.6 mostra a organização dos genes envolvidos no metabolismo do eritritol no genoma de *Paracoccus* sp. SM22M-07.

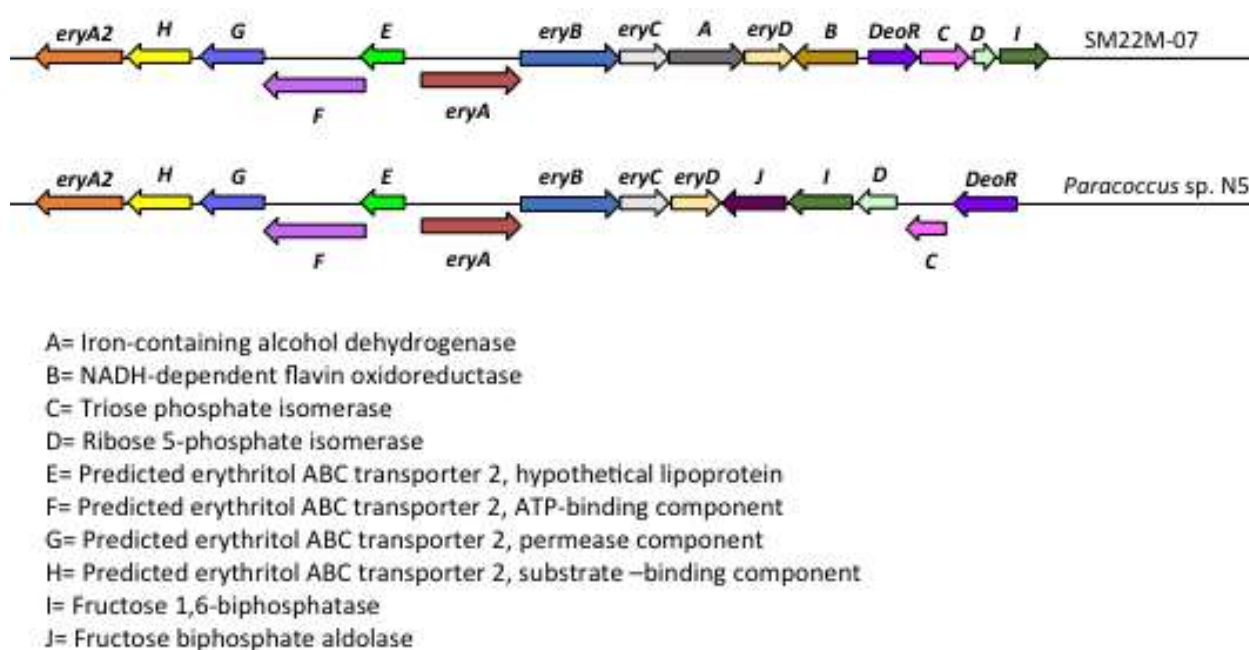


Figura 3.6. Arranjo gênico dos loci putativos do catabolismo de eritritol em *Paracoccus* spp.

Geddes *et al.*(2013) analisaram a organização dos genes envolvidos no catabolismo de eritritol em 19 espécies de Proteobacteria e identificaram três arranjos distintos que refletem a necessidade metabólica ou especialização de cada bactéria. Entretanto, o arranjo observado nos genomas de *Paracoccus* não corresponde a nenhum dos arranjos descritos, assemelhando-se mais ao arranjo observado nos genomas de *Rhizobium* spp. e *Brucella* spp., entretanto, com algumas inovações. Nenhum dos genomas analisados por Geddes *et al.*(2013) apresentaram duas cópias do

gene *eryA*, assim como observado nos genomas de *Paracoccus*. A região do genoma de SM22M-07, representada na figura 3.6, possui um gene que codifica uma álcool desidrogenase e um gene que codifica uma oxidoreductase. Esses genes não são típicos do locus necessário para o catabolismo de eritritol. Os loci de *Sinorhizobium* spp., *Roseobacter* spp. e *Mesorhizobium* spp. também apresentam genes adicionais que estão associados ao catabolismo de adonitol e L-arabitol (Geddes *et al.*, (2013). Dessa forma, os genes adicionais encontrados na região associada ao catabolismo de eritritol no genoma de SM22M-07 podem estar relacionados ao catabolismo de outros polióis. O catabolismo de eritritol confere vantagem competitiva durante a ocupação de nódulos em *Rhizobium leguminarum* e é importante para a determinação da virulência de *Brucella suis*, um agente patogênico animal (Burkhardt *et al.*, 2005). Sabe-se que os corais utilizam como fonte de energia os produtos fotossintéticos gerados pelas algas endossimbióticas. Os principais produtos fotossintéticos já descritos são: glicerol, glicose, inositol, manose e succinato (Burriesci *et al.*, 2012), entretanto, outros compostos também podem ser produzidos pelo coral holobionte, inclusive uma grande diversidade de polióis ou açúcares álcoolis. Assim sendo, sugere-se que a habilidade de *Paracoccus* sp. SM22M-07 em catabolizar um carboidrato que a maioria das bactérias não consegue utilizar pode conferir vantagem competitiva na colonização dos tecidos de coral.

3.3.5 Síntese de exopolissacarídeo succinoglicano

Exopolissacarídeos são moléculas produzidas pelas células bacterianas que são excretadas e podem ficar fortemente associadas à superfície celular (cápsula) ou totalmente dissociadas da célula - sendo secretadas. Muitas vezes, essas moléculas participam da formação da matriz extracelular de biofilmes bacterianos (Branda *et al.*, 2005). Poucos trabalhos identificaram a produção de exopolissacarídeos em bactérias associadas a corais. Na verdade, alguns estudos

apontam que tanto a microbiota quanto os corais produzem substâncias que impedem a formação de biofilmes (Gowrishankar *et al.*, 2012; Wilsanand *et al.* 1999). Dessa forma, não seria intuitivo imaginar que genes relacionados à produção de exopolissacarídeos pudessem conferir vantagem adaptativa ou pudessem estar associados ao estabelecimento de interações bactéria-coral.

Foram encontrados diversos genes que codificam proteínas que podem estar envolvidas na biossíntese do exopolissacarídeo succinoglicano em uma região de aproximadamente 25 Kb, sendo que a maior parte desses genes codificam glicosiltransferases. A produção e a secreção no meio extracelular do succinoglicano pelo *Paracoccus* sp. SM22M-07 foi confirmada por um ensaio simples de crescimento utilizando-se calcofluor, uma molécula que se liga a este polissacarídeo e exibe fluorescência sob luz UV.

O succinoglicano é composto por repetições de unidades de um octo-sacarídeo constituído por uma galactose e sete glicoses, com modificações acetil, succinil e piruvil (Åman *et al.*, 1981). Em *Sinorhizobium meliloti* a biossíntese deste polissacarídeo envolve as proteínas ExoC, ExoN e ExoB, que são responsáveis pela síntese da UDP galactose ativada. Esta é, então, utilizada para a síntese do octo-sacarídeo e, posteriormente, há a adição do piruvato pela ExoV; a polimerização é realizada pela ExoP, ExoQ e ExoT (Dorken, 2009).

Dois dos fatores conhecidos que modulam a produção de succinoglicano são a osmolaridade: a alta osmolaridade aumenta a produção de succinoglicano (Breedveld *et al.*, 1990) e a disponibilidade de fosfato: concentrações baixas (menor que 0,05mM) e altas (>150mM) de fosfato também induzem a produção do polissacarídeo, enquanto que concentrações medianas, como as da maioria dos meios de cultura, reduzem a produção (Mendrygal *et al.*, 2000).

A produção de succinoglicano não é uma característica universal entre as bactérias e está fortemente associada ao estabelecimento da relação simbiótica entre *S. meliloti* e a raiz de alfafa (Reuber & Walker, 1993). Aparentemente, o succinoglicano não participa da formação de

biofilmes em *S. meliloti*. Na verdade, foi demonstrado que o succinoglicano está envolvido em um mecanismo chamado de atração por depleção (Dorken *et al.*, 2012).

A depleção é um mecanismo de atração de partículas de todas as naturezas e, em geral, é causada por polímeros que não se adsorvem às partículas, mas formam um gradiente de potencial químico no sistema. Dorken (2009) propõe um modelo que descreve como a produção de succinoglicano influencia a associação simbiótica entre *S. meliloti* e a raiz da planta. Com base no modelo de Dorken, o modelo abaixo é proposto para descrever a provável importância da produção de exopolissacarídeo succinoglicano em *Paracoccus* sp. SM22M-07 no estabelecimento de uma interação bactéria-coral. Sob as condições oligotróficas e de alta osmolaridade existentes na água do entorno do coral, provavelmente, ocorre grande produção de succinoglicano em SM22M-07 (Figura 3.7-A), o que poderia resultar na formação de um gradiente do polissacarídeo e na atração tanto entre células bacterianas quanto entre a bactéria e a superfície do coral (Figura 3.7-B). Tal fenômeno poderia facilitar a ocupação de nichos ecológicos, permitindo que as células bacterianas formassem agregados estáveis, similares a biofilmes, próximos da superfície do hospedeiro.

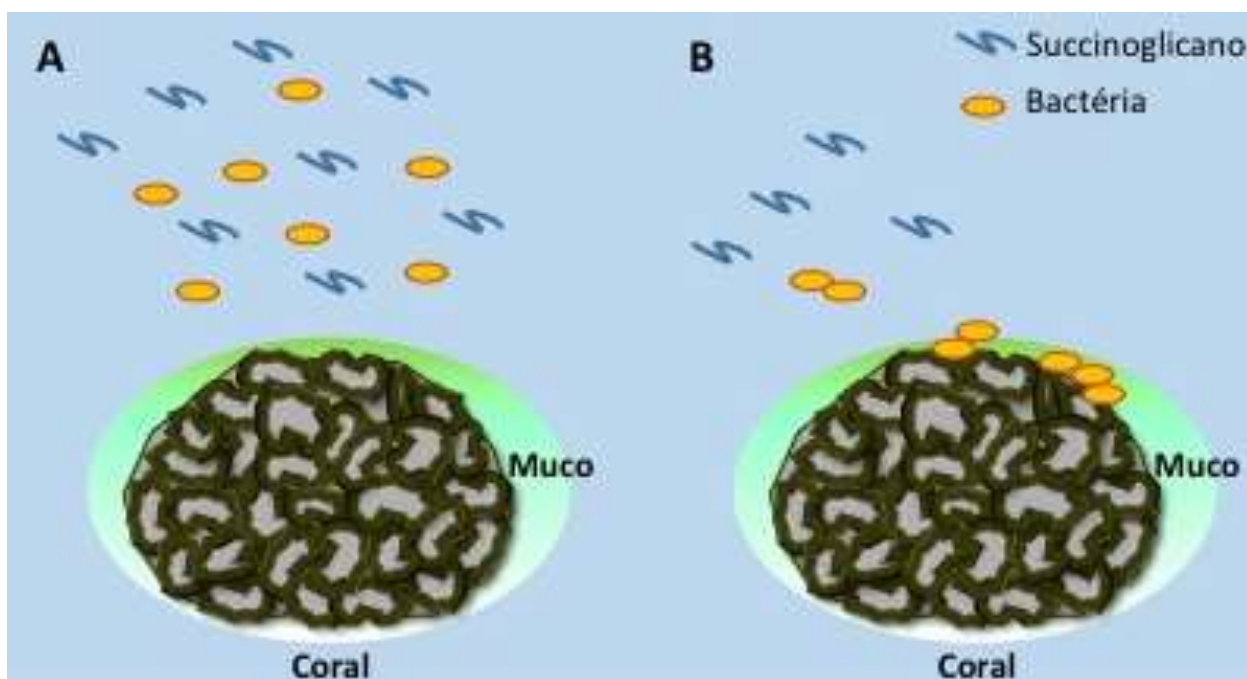


Figura 3.7. Modelo geral da influência da produção do polissacarídeo succinoglicano e do estabelecimento da interação entre *Paracoccus* sp. SM22M-07 e o coral *Mussismilia hispida*. A) Grandes quantidades de succinoglicano são produzidas e excretadas por SM22M-07, B) o que resulta no fenômeno da atração entre as células bacterianas e a superfície do coral pelo mecanismo de depleção.

Experimentos utilizando técnicas de microscopia de fluorescência para a visualização da interação entre bactérias e corais com mutantes de *Paracoccus* sp. SM22M-07 que não produzem succinoglicano e o cnidário modelo *Aiptasia* sp. poderiam confirmar a participação dessa molécula no estabelecimento da interação entre *Paracoccus* sp. SM22M-07 esta bactéria e o coral *M. hispida*.

3.4 CONCLUSÃO

O sequenciamento e análise comparativa de genoma de uma bactéria pertencente à microbiota saudável do muco de coral se revelou como uma abordagem eficiente na identificação de funções bacterianas que auxiliam no estabelecimento, manutenção e estreitamento das relações coral-bactéria.

3.5 REFERÊNCIAS

- Åman P, *et al.* (1981) Structural elucidation, using h.p.l.c.-m.s. and g.l.c.-m.s., of the acidic polysaccharide secreted by rhizobium meliloti strain 1021. Carbohydrate Research 95: 263-282.
- Baumann B, *et al.* (1996) Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. J Bacteriol 178, 4367-74.
- Boetzer M, *et al.* (2011) Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. Bioinformatics 27, 578-579.

- Boyer M, *et al.* (2008) Bacteriophage prevalence in the genus *Azospirillum* and analysis of the first genome sequence of an *Azospirillum brasilense* integrative phage. *Appl Environ Microbiol* 74, 861-74.
- Branda SS, *et al.* (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology* 13(1): 20–26.
- Breedveld MW, *et al.* (1990) Osmotically Induced Oligosaccharide and Polysaccharide Synthesis by *Rhizobium meliloti* Su-47. *Journal of General Microbiology* 136, 2511-2519.
- Burkhardt S, *et al.* (2005) Analysis of the behavior of *eryC* mutants of *Brucella suis* attenuated in macrophages. *Infect Immun* 73, 6782-90.
- Burriesci MS, *et al.* (2012) Evidence that glucose is the major transferred metabolite in dinoflagellate–cnidarian symbiosis. *The Journal of Experimental Biology* 215, 3467-3477.
- Cárdenas A, *et al.* (2012) Shifts in bacterial communities of two Caribbean reef-building coral species affected by white plague disease. *ISME J* 6,502-512.
- Carlos C, *et al.* (2013) Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species. *Sci Rep* 3:1624.
- Christie PJ & Cascales E (2005) Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems. *Mol Membr Biol* 22, 51-61.
- Christie PJ & Cascales E (2005) Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems. *Mol Membr Biol* 22, 51-61.
- Cianciotto NP (2005) Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends in Microbiology* 13, 581-588.
- Dastager SG, *et al.* (2010) *Paracoccus niistensis* sp. nov., isolated from forest soil, India. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99, 501-6.

- Dorken G (2009) Bacterial aggregation by depletion attraction: *Sinorhizobium meliloti* and its extracellular polysaccharide succinoglycan. PhD Thesis Biological Physics- The University of Edinburgh.
- Dorken G, *et al.* (2012) Aggregation by depletion attraction in cultures of bacteria producing exopolysaccharide. *J R Soc Interface* 9, 3490-502.
- Garcia GD, *et al.* (2013) Metagenomic analysis of healthy and white plague-affected *Mussismilia braziliensis* corals. *Microb Ecol* 65,1076-1086.
- Geddes BA, *et al.* (2013) Phylogenetic analysis of erythritol catabolic loci within the Rhizobiales and proteobacteria. *BMC Microbiol* 13, 46.
- Godwin S, *et al.* (2012) The role of coral-associated bacterial communities in Australian Subtropical White Syndrome of *Turbinaria mesenterina*. *PLoS One* 7; e44243.
- Gowrishankar S, *et al.* (2012) Coral-Associated Bacteria as a Promising Antibiofilm Agent against Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* e862374.
- Hernandez D, *et al.* (2013) De novo bacterial genome sequencing: millions of very short reads assembled on a desktop computer. *Genome Research* 18, 802-809.
- John P & Whatley FR (1975) *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion. *Nature* 254, 495–498.
- Jordan DC (1984) Family III Rhizobiaceae. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Kämpfer P, *et al.* (2012) *Paracoccus rhizosphaerae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of the plant *Crossostephium chinense* (L.) Makino (Seremban). *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 2750-6.

- Kelly DP, *et al.* (2006). The genus *Paracoccus*. In *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd edn, vol. 5.
- Khan ST, *et al.* (2008) *Paracoccus marinus* sp. nov., an adonixanthin diglucoside-producing bacterium isolated from coastal seawater in Tokyo Bay. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 383-6.
- Mendrygal KE & Gonzalez JE (2000) Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 182(3): 599-606.
- Meron D, *et al.* (2012) Changes in coral microbial communities in response to a natural pH gradient. *ISME J* 6, 1775-1785.
- Patel PV, *et al.* (2010) Analysis of membrane proteins in metagenomics: networks of correlated environmental features and protein families. *Genome Res* 20, 960-71.
- Paul JH (2008) Prophages in marine bacteria: dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas? *ISME J* 2, 579-589.
- Poretsky RS, *et al.* (2010) Transporter genes expressed by coastal bacterioplankton in response to dissolved organic carbon. *Environ Microbiol* 2, 616-27.
- Pukall R, *et al.* (2003) *Paracoccus seriniphilus* sp. nov., an L-serine-dehydratase-producing coccus isolated from the marine bryozoan *Bugula plumosa*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 443-7.
- Reis AM, *et al.* (2009) Bacterial diversity associated with the Brazilian endemic reef coral *Mussismilia braziliensis*. *Journal of Applied Microbiology* 106:1378-87.
- Reuber TL & Walker GC (1993) Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Cell* 74, 269- 80.
- Rodriguez-Lanetty M, *et al.* (2013) Ecological inferences from a deep screening of the Complex Bacterial Consortia associated with the coral *Porites astreoides*. *Mol Ecol* 22, 4349-4362.
- Sharp KH, *et al.* (2012) Diversity and dynamics of bacterial communities in early life stages of the Caribbean coral *Porites astreoides*. *ISME J* 6, 790-801.

- Sheu SY, *et al.* (2011) *Paracoccus stylophorae* sp. nov., isolated from the reef-building coral *Stylophora pistillata*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 2221-6.
- Siddavattam D, *et al.* (2011) Genome of a Novel Isolate of *Paracoccus denitrificans* Capable of Degrading N,N-Dimethylformamide. *J Bacteriol* 193, 5598–5599.
- Smith GW & Hayasaka SS (1982) Nitrogenase activity associated with *Halodule wrightii* roots. *Applied and Environmental Microbiology* 43:1244–1248
- Sowell SM, *et al.* (2011) Environmental proteomics of microbial plankton in a highly productive coastal upwelling system. *ISME J* 5, 856–865.
- Stouthamer AH (1992) Metabolic regulation including anaerobic metabolism in *Paracoccus denitrificans*. *J Bioenerg Biomembr* 23, 163–185.
- Stowers MD (1985) Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Annu Rev Microbiol* 39, 89-108.
- Sun LN, *et al.* (2013) *Paracoccus huijuniae* sp. nov., an amide pesticide-degrading bacterium isolated from activated sludge of a wastewater biotreatment system. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 1132-7.
- Tamura K, *et al.* (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28, 2731-2739.
- Teng Y, *et al.* (2010) Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Bioresource Technol*, 101, 3437-3443.
- Vega Thurber R, *et al.* (2009) Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. *Environ Microbiol* 11, 2148-2163.
- Wegley L, *et al.* (2007) Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. *Environ Microbiol* 9, 2707-2719.

- Wilsanand V, *et al.* (1999) Antibacterial activities of anthozoan corals on some marine microfoulers *Microbios* 99, 137-45.
- Witt V, *et al.* (2011) Effect of substrate type on bacterial community composition in biofilms from the Great Barrier Reef. *FEMS Microbiol Lett* 323,188-195.
- Yokouchi H, *et al.* (2006) Whole-metagenome amplification of a microbial community associated with scleractinian coral by multiple displacement amplification using phi29 polymerase. *Environ Microbiol* 8, 1155-1163.
- Yost CK, *et al.* (2006) Characterization of genes involved in erythritol catabolism in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Microbiology* 152, 2061-74.
- Zhou Y, *et al.* (2011) PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res* 39, W347-52.
- Zhu S, *et al.* (2013). *Paracoccus tibetensis* sp. nov., isolated from Qinghai-Tibet Plateau permafrost. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 1902-5 .

III. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste trabalho representam um extenso inventário da diversidade microbiana associada a um dos grupos de organismos mais ameaçados pelas mudanças climáticas globais.

Supõe-se que o principal papel das comunidades microbianas associadas à superfície ou ao próprio muco de corais está relacionado à proteção contra patógenos. Dessa maneira, a estabilidade dessas comunidades frente às variações ambientais seria uma propriedade fundamental para o desempenho de sua função. Os resultados deste trabalho indicam que a comunidade microbiana do muco não é apenas distinta do ambiente do entorno, mas, ainda, é estável ao longo das estações do ano. Há evidências para sugerir que a comunidade do muco é mais robusta e estável do que a do ambiente do entorno, já que foram encontradas diferenças entre as estações do ano na água e no sedimento e essas diferenças não se refletiram nas comunidades do muco.

Apesar de terem sido encontradas claras diferenças entre a composição taxonômica das comunidades dos três habitats, não foi possível determinar uma microbiota “core” de cada espécie de coral. Entretanto, a composição taxonômica da microbiota do coral *Palythoa caribaeorum* é bem distinta das demais espécies pertencentes à ordem Scleractinia, contudo, entre as espécies dessa ordem, a microbiota apresenta muitas sobreposições. Fazem parte dessa microbiota “core” dos corais escleractíneos encontrados no litoral de São Paulo, as OTUs classificadas nos gêneros *Pseudomonas* (Gammaproteobacteria), *Acinetobacter* (Gammaproteobacteria), *Brachybacterium* (Actinobacteria), *Stenotrophomonas* (Gammaproteobacteria), *Methylobacter* (Gammaproteobacteria), *Propionibacterium* (Actinobacteria), *Escherichia* (Gammaproteobacteria), *Atopobium* (Actinobacteria) e *Janthinobacterium* (Betaproteobacteria).

A existência de uma microbiota “core” da ordem Scleractinia já foi proposta por Neulinger *et al.*(2008) e Kellog *et al.*(2009) e os resultados apresentados no Capítulo 1 deste trabalho corroboram essa ideia.

O desenvolvimento da microbiota “core” pode ser moldado tanto por substâncias químicas, produzidas exclusivamente por todos os representantes da ordem, quanto por características físicas provenientes do exoesqueleto calcário, o qual gera micro-habitats diferentes dos proporcionados por corais moles.

Apesar de aparentemente não existir uma microbiota “core” espécie-específica, foram encontradas OTUs hospedeiro-específicas no muco, o que é um dos resultados mais interessantes deste trabalho. A OTU 23022 foi encontrada apenas nas amostras de *Mussismilia hispida*. Os principais *hits* dessa OTU nos bancos de dados são de sequências de 16S rDNA derivadas de bibliotecas de corais endêmicos brasileiros do gênero *Mussismilia*, o que é um forte indício de que essa seja uma OTU específica deste gênero.

Esta descoberta demonstra que, apesar da natureza efêmera do muco, este é capaz de sustentar fortes associações bacterianas. Os resultados deste trabalho estão de acordo com o modelo proposto por diversos autores (Ritchie & Smith, 2004; Brown & Bythell, 2005; Guppy & Bythell, 2006), modelo em que sugere-se que propriedades específicas do muco de diferentes espécies de corais afetam a formação da comunidade bacteriana. Apesar do muco ser continuamente ou periodicamente liberado da superfície do coral, a proporção de muco repostado e/ou a frequência da troca não é suficiente para impedir que a comunidade atinja a estabilidade. O sequenciamento do genoma da bactéria representada pela OTU 23022, a partir da metodologia *single-cell* -que permite o isolamento de uma única célula bacteriana, a amplificação total do genoma, a sua identificação a partir da sequência do 16S rDNA e o sequenciamento do genoma completo-, poderá trazer informações valiosas para a compreensão das associações espécie-específicas entre bactérias e corais.

Burke *et al.* (2011a e b) estudaram as comunidades de superfícies de uma espécie de alga marinha comparando sua composição taxonômica e gênica à comunidade da água do entorno. Em

relação à composição taxonômica observaram que as comunidades de alga diferiram das da água, mas não conseguiram encontrar uma microbiota “core” presente em todas as amostras de alga. Entretanto, quando esses autores analisaram a composição gênica, eles encontraram grupos funcionais que estavam presentes em todas as amostras de alga. Propuseram, então, que a função que os micro-organismos desempenham é mais importante na determinação da comunidade microbiana de superfície de organismos marinhos do que a taxonomia desses micro-organismos. Nesse sentido, o sequenciamento e análise comparativa dos metagenomas das microbiotas das espécies de corais escleractíneos *Madracis decactis* e *Mussismilia hispida* revelaram funções abundantes dessas comunidades que podem ser relevantes para a colonização e sobrevivência das bactérias nos tecidos dos corais. Os resultados evidenciam a importância dos vírus e fagos na modulação da microbiota de corais bem como sua relevância como vetores de transferência de genes, que estão relacionados a funções que conferem vantagem competitiva ou adaptativa nesse ambiente.

O sequenciamento do genoma de uma bactéria isolada do muco de *M. hispida* também aponta para a elevada ocorrência de eventos de transferência horizontal de genes na microbiota de corais: foram encontrados diversos genes de transposases e integrases, genes relacionados à formação de GTAs e prováveis regiões de inserção de fagos no genoma do isolado SM22M-07.

Levando-se em consideração todos os resultados apresentados neste trabalho e em outros trabalhos da literatura, um modelo geral que descreve como a microbiota de corais é estabelecida e mantida foi hipotetizado.

A comunidade bacteriana da água do mar é dominada por bactérias pertencentes aos grupos das Alphaproteobacteria, SAR11 e Cyanobacterias (Carlos *et al.*, 2013; Sweet *et al.*, 2011). A colonização primária da superfície do coral se dá por micro-organismos que se encontram em baixa abundância na água do mar e por bactérias transmitidas diretamente por contato com partículas de

sedimento, as quais conseguem utilizar os nutrientes disponíveis no muco. Por isso, a maior parte dos trabalhos encontram uma comunidade bacteriana associada ao muco, distinta das comunidades dos ambientes adjacentes. Fatores antimicrobianos e inibidores de formação de biofilmes que são produzidos pelo coral, além de uma alta concentração de fagos líticos e lisogênicos, selecionam os micro-organismos colonizadores, inibindo o crescimento de bactérias possivelmente patogênicas. Uma vez que essa comunidade atinge o clímax, os micro-organismos ali presentes passam a trocar genes com funções relevantes para a sobrevivência nesse habitat, genes que permitem um estreitamento da relação com o hospedeiro (como os genes do sistema de secreção tipo IV) e genes que conferem resistência a possíveis estresses tanto bióticos quanto abióticos, o que mantém a estabilidade da comunidade frente às alterações ambientais e impede a colonização de bactérias patogênicas (Figura III.1).

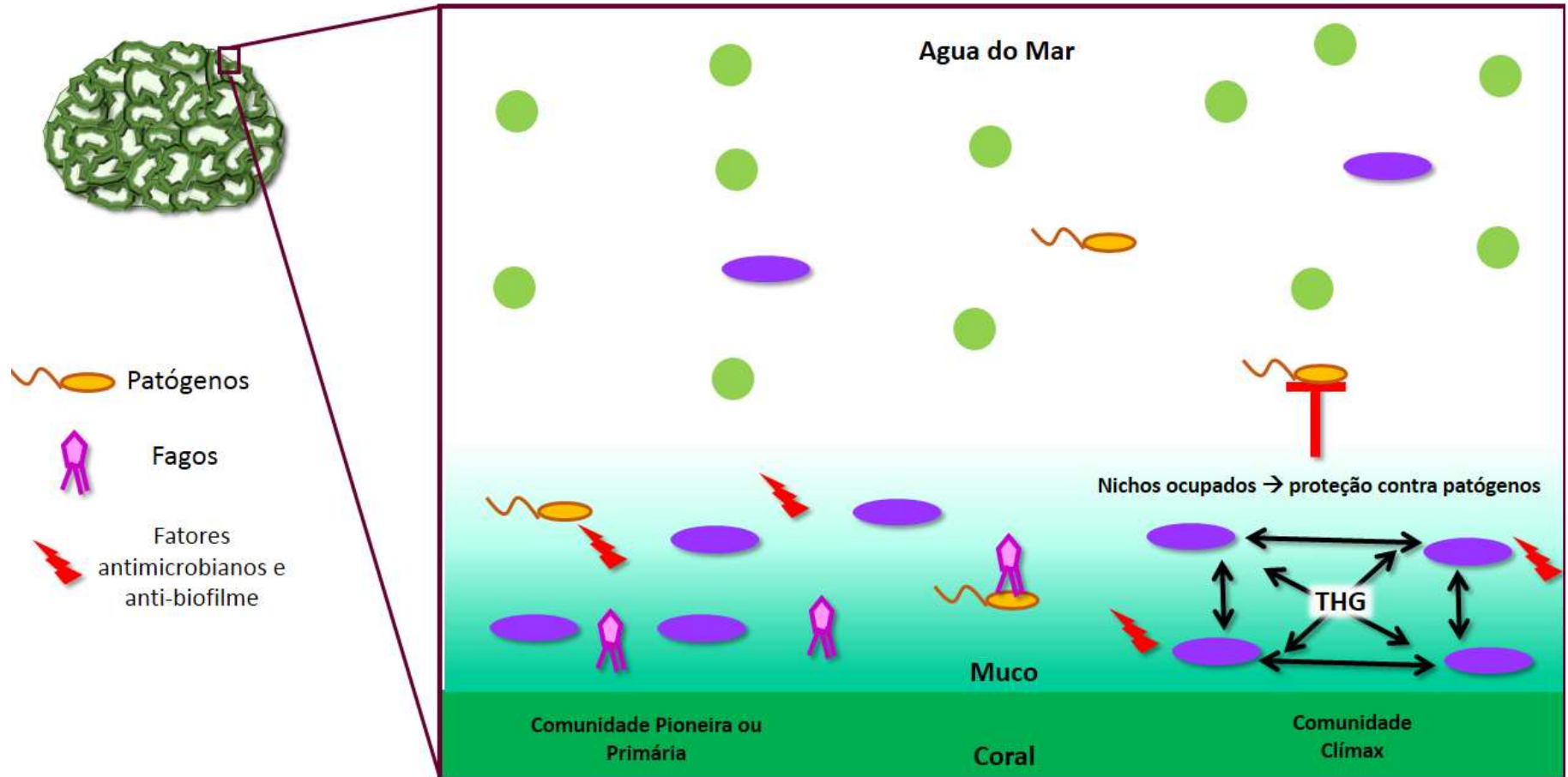


Figura III.1. Modelo geral do estabelecimento de uma comunidade estável no muco de corais. Os círculos verdes representam bactérias dominantes na água do mar e as elipses roxas as bactérias dominantes no muco de corais. A colonização primária da superfície do coral se dá por micro-organismos que se encontram em baixa abundância na água do mar e que conseguem utilizar os nutrientes disponíveis no muco. Fatores antimicrobianos e inibidores de formação de biofilmes que são produzidos pelo coral, além de uma alta concentração de fagos selecionam os micro-organismos colonizadores, inibindo o crescimento de bactérias possivelmente patogênicas. Uma vez que essa comunidade atinge o clímax, os micro-organismos ali presentes passam a trocar genes com funções relevantes para a sobrevivência nesse habitat, o que mantém a estabilidade da comunidade frente às alterações ambientais e impede a colonização de bactérias patogênicas.

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul SF, *et al.* (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-10
- Bourne DG & Munn CB (2005) Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. *Environmental Microbiology* 7:162–1,174.
- Brown BE & Bythell JC (2005) Perspectives on mucus secretion in reef corals. *Marine Ecology Progress Series* 296: 291–309.
- Brusca RC & Brusca GJ (2003) *Invertebrates*. 2nd Edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 936pp.
- Burke C, *et al.* (2001a) Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*. *ISME J* 5: 590-600.
- Burke C, *et al.* (2001b) Bacterial community assembly based on functional genes rather than species. *PNAS* 108: 1488-1493.
- Ceh J, *et al.* (2011) Coral-associated bacterial communities on Ningaloo Reef, Western Australia. *FEMS Microbiol Ecol* 75:134-144.
- Chimetto LA, *et al.* (2009) Genomic diversity of vibrios associated with the Brazilian coral and its sympatric zoanthids (*Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Zoanthus solanderi*). *Journal of Applied Microbiology* 106:1818-26.
- Collins AG (2002) Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. *Journal of Evolutionary Biology* 15:418- 432.
- Davidson OG (1998) *The Enchanted Braid: Coming to Terms with Nature on the Coral Reef*, John Wiley & Sons, Inc.
- de Castro AP, *et al.* (2010) Bacterial Community Associated with Healthy and Diseased Reef Coral *Mussismilia hispida* from Eastern Brazil. *Microbiol Ecol* 59:658-667.

- Dinsdale EA, *et al.* (2008) Microbial ecology of four coral atolls in the Northern Line Islands. *Plos One* 3:1584
- Ducklow HW & Mitchell R (1979) Bacterial populations and adaptations in the mucus layers on living corals. *Limnology and Oceanography* 24:715–725.
- Fallowski PG, *et al.* (1984) Light and the bioenergetics of symbiotic coral. *Bioscience* 34:705–709.
- Garcia GD *et al.* (2013) Metagenomic analysis of healthy and white plague-affected *Mussismilia braziliensis* corals. *Microb Ecol* 65: 1076-1086.
- Guppy R & Bythell JC (2006) Environmental effects on bacterial diversity in the surface mucus layer of the reef coral *Montastraea faveolata*. *Marine Ecology Progress Series* 328: 133–142.
- Haemig PD (2008) A Barreira Amazônica. *ECOLOGIA.INFO* 29.
- Huse SM, *et al.* (2007) Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biology* 8:143.
- IPCC (2007) Climate Change 2007: Summary for Policymakers of the Synthesis Report of the IPCC Fourth Assessment Report.
- Jatkar AA, *et al.* (2010) Coral mucus: the properties of its constituent mucins. *Biomacromolecules*, 11: 883–888.
- Kellogg CA *et al.* (2009) Culture-independent characterization of bacterial communities associated with the cold-water coral *Lophelia pertusa* in the northeastern Gulf of Mexico. *Appl Environ Microbiol* 75: 2294–2303.
- Koren O & Rosenberg E (2006) Bacteria Associated with Mucus and Tissues of the Coral *Oculina patagonica* in Summer and Winter. *Applied and Environmental Microbiology* 72:5254-5259.
- Kushmaro A, *et al.* (1996) Bacterial infection and coral bleaching. *Nature* 380:396–3.
- Kushmaro A, *et al.* (1997) Bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. *Marine Ecology Progress Series* 147:159–165.

- Kushmaro A, *et al.* (1998) Effect of temperature on bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio shiloi* AK-1. *Marine Ecology Progress Series* 171:131–137.
- Leggat W, *et al.* (2007) The hologenome theory disregards the coral holobiont. *Nature Reviews Microbiology* 14.
- Lema KA, *et al.* (2012) Corals form characteristic associations with symbiotic nitrogen-fixing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 78(9):3136-3144.
- Liu G, *et al.* (2004) Overview of NOAA coral reef watch program's near-real time satellite global coral bleaching monitoring activities. *Proc 10th Int Coral Reef Symp, Okinawa, Japan* 1:1783-1793.
- Migotto AE (1997) Anthozoan bleaching on the southeastern coast of Brazil in the summer of 1994. In: *Proceedings of the VI International Conference on Coelenterate Biology, Leiden, The Netherlands*: 329-335.
- Migotto AE, *et al.* (1999) Filo Cnidaria. In: Migotto, A. E. & Tiago, C. G.. (Org.). *Biodiversidade do Estado de São Paulo. Síntese do Conhecimento ao final do Século XX*. 1 ed. São Paulo: Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de São Paulo, 3: 33-46.
- Neulinger SC, Jarnegren J, Ludvigsen M, Lochte K & Dullo W-C (2008) Phenotype-specific bacterial communities in the cold-water coral *Lophelia pertusa* (Scleractinia) and their implications for the coral's nutrition, health, and distribution. *Appl Environ Microbiol* 74: 7272–7285.
- Nogueira JMM (2003) Fauna living in colonies of *Mussismilia hispida* (Verrill) (Cnidaria: Scleractinia) in four South-eastern Brazil islands. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46:421-432.
- Ocean Biogeography Information System. <http://www.iobis.org>. Acessado no dia 9 de dezembro de 2008.

- Overbeek R *et al.*, (2005) The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Research* 33:5691–5702.
- Reis AM, *et al.* (2009) Bacterial diversity associated with the Brazilian endemic reef coral *Mussismilia braziliensis*. *Journal of Applied Microbiology* 106:1378-87.
- Reshef L, *et al.* (2006) The Coral Probiotic Hypothesis. *Environmental Microbiology* 8:2067–2073.
- Ritchie K.B. (2006) Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series* 322: 1–14.
- Ritchie KB & Smith WG (1997) Physiological comparisons of bacterial communities from various species of scleractinian corals. *Proceedings of the Eighth International Coral Reef Symposium*.
- Ritchie KB, Smith GW (2004) Microbial communities of coral surface mucopolysaccharide layers. In Rosenberg E, Loya Y, eds. *Coral Health and Disease* Springer - verlag Berlin Heidelberg. pp 259–263.
- Ronaghi M (2001) "Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing". *Genome Research* 11: 3–11.
- Rosenberg E, *et al.*, (2007a) Coral Microbiology. *Oceanography* 20:146-154.
- Rosenberg E, *et al.*, (2007b) The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology* 5: 355–362.
- Ruppert EE, *et al.* (2004) *Invertebrate Zoology, a functional evolutionary approach*. Thomson. Belmont.
- Schloss PD & Handelsman J (2005). Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1501-6.
- Schöttner S *et al.* (2009) Inter- and intra-habitat bacterial diversity associated with cold-water corals. *ISME J* 3: 756–759.

- Schöttner S *et al.* (2012) Spatial scales of bacterial diversity in cold-water coral reef ecosystems. PLoS One 7: e3209.
- Sharp KH & Ritchie KB (2012) Coral-associated bacterial communities in the face of global climate change. Biological Bulletin 223(1): 66-77.
- Sharp KH, Ritchie KB, Schupp P, Ritson-Williams R & VJ Paul (2010) Bacterial acquisition in juveniles of several broadcast spawning coral species. PLoSOne 5(5): e10898.
- Shnit-Orland M & Kushmaro A (2009) Coral mucus-associated bacteria: a possible first line of defense. FEMS Microbiology Ecology 67:371-80.
- Smith GW & Hayasaka SS (1982) Nitrogenase activity associated with *Halodule wrightii* roots. Applied and Environmental Microbiology 43:1244–1248
- Sun *et al.* (2009) ESPRIT: estimating species richness using large collections of 16S rRNA pyrosequences. Nucleic Acids Research 37:76.
- Sussman M, *et al.*, (2003) The marine fireworm *Hermodice carunculata* is a winter reservoir and spring-summer vector for the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. Environmental Microbiology 5:250–255.
- Sweet MJ *et al.* (2011) Development of bacterial biofilms on artificial corals in comparison to surface-associated microbes of hard corals. PLoS One. 6: e21195
- Thurber RV, *et al.* (2008) Metagenomic analysis indicates that stressors induce production of herpes-like viruses in the coral *Porites compressa*. Proc Natl Acad Sci 105:18413–18.
- Thurber RV, *et al.* (2009) Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. Environmental Microbiology 11:2148-2163.
- Vezzulli L, Colwell RR, Pruzzo C (2013) Ocean warming and spread of pathogenic vibrios in the aquatic environment. Microbial Ecology, 65(4), 817-825.

- Wegley L, *et al.* (2007) Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. *Environmental Microbiology* 9:2707–2719.
- Wild C, *et al.* (2010) Organic matter release by Red Sea coral reef organisms: potential effects on microbial activity and in situ O₂ availability. *Mar Ecol Prog Ser* 411:61-71.
- Wilkinson C (2008) Status of Coral Reefs of the World: 2008. Global Coral Reef Monitoring Network and Reef and Rainforest Research Center, Townsville, Australia.

V. APÊNDICES

V.1 APÊNDICE I

Supplementary Material of Chapter I.

Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of four coral species from the coast of Brazil

Camila Carlos¹, Tatiana T. Torres², Laura M. M. Ottoboni^{1*}

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Rua Candido Rondon 400 - Laboratório de Biologia Molecular e Ambiental, Cidade Universitária, CP 6010, CEP 13083-875, Campinas, SP, Brazil

²Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 277, Cidade Universitária, CEP 05508-090, São Paulo, SP, Brazil

*Corresponding author: ottoboni@unicamp.br

Supplementary Material

Table S1. The most five influential OTUs responsible for the differences between the habitats studied identified by SIMPER analysis.

OTU	RDP Classifier [bootstrap value]	blastn (identity)	Description (GENBANK)	Title (GENBANK)	Authors (GENBANK)	Habitat
23763	GPIIA [100%]	AY135675 (99%)	uncultured bacterium; Southern Ocean	Rapid response of bacterioplankton to iron fertilization in the Southern Ocean	Arrieta. J.M.. <i>et al.</i>	
16514	Proteobacteria[53%]	JQ347437 (100%)	uncultured bacterium; Da Ya Bay; Acropora pruinosa	Direct Submission	Xu. C.Y.. <i>et al.</i>	
24476	Alphaproteobacteria[74%]	JN655284 (99%)	uncultured bacterium; seawater	A specific mix of generalists: bacterial symbionts in Mediterranean Ircinia spp	Erwin. P.M.. <i>et al.</i>	
3098	Bacillus[89%]	Bacillus pumilus strain MRI587 (100%)	Bacillus pumilus; milk from dairy farm	isolation and presumptive identification of Staphylococcus aureus associated with bovine mastitis	Bautista-Trujillo. G.U.. <i>et al.</i>	Water
11926	Rhodobacteraceae[100%]	HE647148 (99%)	uncultured bacterium; Atoll lagoon water	particle-attached prokaryotes in the tropical lagoon of Ahe atoll (Tuamotu Archipelago) and its surrounding oceanic waters	Michotey. V.. <i>et al.</i>	
23270	Sphingomonas[65%]	Sphingomonas sp. P9-50 (100%)	Sphingomonas sp. P9-50; host branch section	Conjugative transfer of an IncP plasmid and establishment of transconjugants in the indigenous microflora of poplar	Ulrich. A.. <i>et al.</i>	M. decactis mucus

6997	Pseudonocardiaceae[66%]	Rhodococcus erythropolis strain M-5-188 (99%)	Rhodococcus erythropolis	Microbial weathering of volcanic rocks	Simpson. A.E.. <i>et al.</i>
19915	Brachybacterium[88%]	JN707816 (100%)	uncultured bacterium; thermophilic anaerobic digester	Microbial community structure of a thermophilic anaerobic digester	Smith. A.M.. <i>et al.</i>
10613	Escherichia/Shigella[97%]	Escherichia coli strain p20-1 (100%)	Escherichia coli; soil	Microbial scout hypothesis and microbial discovery	Buerger. S.. <i>et al.</i>
6481	Acinetobacter[100%]	Acinetobacter sp. SR10-S-8 (100%)	Acinetobacter sp. SR10-S-8; arctic marine sediment	Comparative analysis of bacterial diversity of marine sediment from Arctic by culture-dependent and culture-independent approaches	Lin. X.Z. and Song. W.Z.
14290	Alphaproteobacteria[88%]	HQ837587 (98%)	uncultured bacterium; coral reef;	Bacterial communities associated with three endemic Mussismilia species in disturbed coral reef environment from Abrolhos Bank. Brazil	Castro. A. and Kruger. R.
20636	Alphaproteobacteria[88%]	HQ837587 (99%)	uncultured bacterium; coral reef;	Bacterial communities associated with three endemic Mussismilia species in disturbed coral reef environment from Abrolhos Bank. Brazil	Castro. A. and Kruger. R. <i>M. hispida mucus</i>
25133	Bacteroidetes"[64%]	HQ837320 (100%)	uncultured bacterium; coral reef	Bacterial communities associated with three endemic Mussismilia species in disturbed coral reef environment from Abrolhos Bank. Brazil	Castro. A. and Kruger. R.

				Archaea. bacteria. and algal plastids	
23022	Chromatiales[55%]	FJ216075 (99%)	uncultured gamma	associated with the reef-building corals	Lins-de-Barros.
			proteobacterium ; coral	Siderastrea stellata and Mussismilia hispida	M.M.. <i>et al.</i>
				from Buzios. South Atlantic Ocean. Brazil	
4096	Bacteria[100%]	JF504664 (93%)	uncultured bacterium; estuary	Bacteria diversity in the pearl river estuary	Sun. F. and
			sediment	sediment	Wang. Y.
			uncultured gamma		
7634	Gammaproteobacteria[100%]	FJ654568 (95%)	proteobacterium; tropical soft	The diversity of phnA gene homologs in	Thomas. S.F.. <i>et</i>
			coral subjected to temperature	temperature-stressed Cnidarian-associated	<i>al.</i>
			stress; Sinularia sp.	bacteria	
			uncultured gamma		
7481	Gammaproteobacteria[99%]	FJ654568 (95%)	proteobacterium; tropical soft	The diversity of phnA gene homologs in	Thomas. S.F.. <i>et</i>
			coral subjected to temperature	temperature-stressed Cnidarian-associated	<i>al.</i>
			stress; Sinularia sp.	bacteria	
			uncultured gamma		<i>P. caribaeorum</i>
13276	Gammaproteobacteria[100%]	FJ654568 (96%)	proteobacterium; tropical soft	The diversity of phnA gene homologs in	Thomas. S.F.. <i>et</i>
			coral subjected to temperature	temperature-stressed Cnidarian-associated	<i>al.</i>
			stress; Sinularia sp.	bacteria	mucus
8670	Cyanobacteria[87%]	GQ483362 (99%)	uncultured bacterium;	Characterization of the microbial community	Lesser. M.P.. <i>et</i>
			unidentified ostracod	associated with a Caribbean ostracod	<i>al.</i>
			uncultured bacterium; biofilm.	Effects of ocean acidification on microbial	
300	Cyanobacteria[98%]	HQ601890.1 (100%)	glass. aquaria experiment pH	community composition of. and oxygen fluxes	Witt. V.. <i>et al.</i>
			8.03. temp 23C	through. biofilms from the Great Barrier Reef	

25498	<i>Pseudomonas</i> [100%]	JQ766617 (100%)	uncultured bacterium; hyperalkaline Allas Springs	Microbial diversity in samples from the hyperalkaline Allas Springs. Troodos mountains. Cyprus	Rizoulis. A.. <i>et al.</i>
17001	<i>Tenacibaculum</i> [61%]	GU472127 (98%)	uncultured bacterium; BBD affected corals	BBD microbial consortium seasonal changes	Arotsker. L.. <i>et al.</i>
5341	<i>Janthinobacterium</i> [77%]	EU537175 (100%)	uncultured bacterium; antecubital fossa (inner elbow) skin	A diversity profile of the human skin microbiota	Grice. E.A.. <i>et al.</i>
9209	Alphaproteobacteria[68%]	FJ041420.1 (99%)	uncultured bacterium; <i>Lophelia</i> <i>pertusa</i> (scleractinian coral)	Culture-independent characterization of bacterial communities associated with the cold-water coral <i>Lophelia pertusa</i> in the northeastern Gulf of Mexico	Kellogg. C.A.. <i>et al.</i>
16320	<i>Haliangium</i> [89%]	FJ175501 (95%)	uncultured bacterium; hydrocarbon seep sediment in Timor Sea	Microbial diversity in sediments associated with a shallow methane seep in the tropical Timor Sea of Australia reveals a novel aerobic methanotroph diversity	Wasmund. K.. <i>et al.</i>
15711	<i>Ilumatobacter</i> [92%]	JQ580010.1 (100%)	uncultured actinobacterium; sediments from Figueiras Beach	Microbial communities from marine oil- polluted sediments affected after the Prestige oil spill (Galicia. Spain)	Acosta Gonzalez. <i>et al.</i>
16689	<i>Mesorhizobium</i> [90%]	AB550444.1 (100%)	uncultured alpha proteobacterium; <i>Apostichopus</i> <i>japonicus</i> (Selenka) coelomic fluid	Microbial communities associated with holothurians: presence of unique bacteria in the coelomic fluid	Sediment Enomoto. M.. <i>et al.</i>

19913	Actinobacteria[86%]	JF907614.1 (100%)	uncultured bacterium; sediment sample	Diversity of methylotrophs	Kumar. M.. <i>et al.</i>
1038	Microbacteriaceae[93%]	AJ575516.1 (99%)	uncultured actinobacterium; freshwater	Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages	Warnecke. F.. <i>et al.</i>
20185	Gammaproteobacteria[98%]	JF835645.1 (100%)	uncultured bacterium; bleached colonies; Siderastrea stellata	Coral-associated microorganisms with the bleached colonies of Siderastrea stellata	Lins-de-Barros. M.M.. <i>et al.</i>

Table S2. Mean frequency of the OTUs identified by SIMPER analysis as the most influential for the differences between the habitats.

OTU	Percent Contribution to Difference	Average Relative Abundance in:					Sediment Samples
		Water Samples	<i>M. decactis</i> Samples	<i>T. coccinea</i> Samples	<i>M. hispida</i> Samples	<i>P.caribaeorum</i> Samples	
7634	5.65	0.714	1.26	0.57	0.602	46.7	0.16
23763	5.441	20.9	9.2	5.32	7.35	5.1	4.58
16514	4.549	15.1	8.89	7.59	5.42	2.11	0.933
3098	3.414	12	0.207	0.214	0.24	0.0375	0.0574
25498	2.531	0.62	3.22	14.5	5.53	2.77	1.6
23270	1.307	1	9	0.932	2.63	0.399	0.931
6997	1.216	1.79	3.67	0.113	0.203	0.0785	1.76
24476	0.745	2.44	0.98	0.848	0.787	0.366	0.1
1038	0.723	0.375	0.222	0.304	1.06	0.0622	1.81
16689	0.6121	0.0967	0.788	1.07	0.866	0.319	1.98
15711	0.5832	0.333	0.565	0.551	1.42	0.448	2.1
19913	0.5566	0.0724	0.65	0.289	0.728	0.219	1.85
11926	0.5089	1.85	1.05	0.881	0.788	0.256	0.383
20185	0.4925	0.0341	0.599	0.183	0.6	0.335	1.65
5341	0.3277	0.0732	0.465	1.63	0.893	0.282	0.214
14290	0.2593	0.000458	0	0	2.25	0	0
20636	0.2562	0.0109	0	0	2.2	0	0
6481	0.2176	0.00848	2.33	0.087	0.00124	0	0.00199
7481	0.2152	0.0115	0.0603	0.0654	0.0344	1.76	0.00427
17001	0.1923	0.000727	0.00854	1.66	0	0	0.00166
9209	0.1854	0.00119	0.0779	1.56	0.00249	0	0.00307
10613	0.1767	0.183	1.15	0.252	0.165	0.0115	0.0681
19915	0.1355	0.0108	0.892	0.115	0.373	0.0319	0.0355
13276	0.1319	0.00314	0.0209	0	0.00249	1.13	0.00128
16320	0.09686	0	0	0.84	0.00124	0	0
8670	0.03808	0.00022	0	0.00158	0	0.327	0.000945
25133	0.02319	0	0	0	0.202	0	0
23022	0.02219	0	0	0	0.193	0	0
300	0.02212	0.00022	0	0.00326	0	0.15	0.0189
4096	0.01709	0	0	0	0.148	0	0

V.1 APÊNDICE II

Tabela S1. Informações sobre os metagenomas utilizados neste trabalho.

Metagenome	MG-RAST ID	Number of sequences	Average read length	Latitude	Longitude	Environment	Lifestyle	Type	Climate	MDA	Cloning	Reference
A.pompejana	4441102.3	293065	990	9.84	-104.28	Marine	Host-associated	Microbial	Temperate	no	yes	Grzymiski <i>et al.</i> 2008
Acropora	4445755.3	403686	344	-19.1	146.5	Marine	Host-associated	Microbial	Tropical	yes	no	Littman <i>et al.</i> 2011
ArcticVir	4440306.3	611026	100	71.34	128.19	Marine	Free-living	Viral	Polar	yes	no	Angly <i>et al.</i> 2006
ArcticSoil	4450125.3	98848	413	80.6	13.48	Terrestrial	Free-living	Microbial	Polar	no	no	Tvei <i>et al.</i> 2013
BBCVir	4440305.3	368025	103	32.53	97.51	Marine	Free-living	Viral	Temperate	yes	no	Angly <i>et al.</i> 2006
BlackMine	4440282.3	248038	101	47.81	-92.24	Terrestrial	Free-living	Microbial	Temperate	yes	no	Edwards <i>et al.</i> 2006
CFLung	4440051.3	28171	83	32.87	-117.1	Terrestrial	Host-associated	Viral	Temperate	yes	no	Willner <i>et al.</i> 2009
ChickenCecum	4440283.3	272236	105	40.11	-88.2	Terrestrial	Host-associated	Microbial Plasmidial	Temperate	no	no	Qu <i>et al.</i> 2008
CowRumen	4441679.3	23805	102	40.5	-88.99	Terrestrial	Host-associated	Microbial	Temperate	yes	no	Brown <i>et al.</i> 2012
ForestSoil	4446153.3	642197	435	18.3	-65.83	Terrestrial	Free-living	Microbial	Tropical	no	no	Reference not found
GOMVir	4440304.3	222659	102	26.09	88.73	Marine	Free-living	Viral	Temperate	yes	no	Angly <i>et al.</i> 2006
Gut_TS1	4440452.7	313773	1003	42.8	10.14	Terrestrial	Host-associated	Microbial	Temperate	no	yes	Turnbaugh <i>et al.</i> 2009
Gut_TS5	4440461.5	192843	249	38.64	-90.3	Terrestrial	Host-associated	Microbial	Temperate	no	no	Turnbaugh <i>et al.</i> 2009
GutlessWorm	4441115.3	429846	212	38.63	-90.25	Marine	Host-associated	Microbial	Temperate	no	no	Woyke <i>et al.</i> 2006
HotSpring	4460449.3	685935	581	40.69	-111.2	Terrestrial	Free-living	Microbial	Temperate	no	no	Reference not found
KingLIMic	4440037.3	143977	105	6.38	-162.33	Marine	Free-living	Microbial	Tropical	yes	no	Dinsdale <i>et al.</i> (2008)
KingLIVir	4440036.3	79503	109	6.38	-162.33	Marine	Free-living	Viral	Tropical	yes	no	Dinsdale <i>et al.</i> (2008)
Madracis	4516541.3	29358	513	-23.84	-45.16	Marine	Host-associated	Viral	Tropical	yes	no	Present work
Mussismilia	4516694.3	368772	482	-23.84	-45.16	Marine	Host-associated	Viral	Tropical	yes	no	Present work
Polynesia	4441167.3	46267	1075	-17.47	-149.812	Marine	Free-living	Microbial	Tropical	no	no	Rusch <i>et al.</i> 2007
Porites	4440319.3	266015	103	9.33	-82.84	Marine	Host-associated	Microbial	Tropical	yes	no	Wegley <i>et al.</i> 2007
RedMine	4440281.3	27582	107	47.81	-92.24	Terrestrial	Free-living	Microbial	Temperate	yes	no	Edwards <i>et al.</i> 2006

SARVir	4440322.3	357238	105	32.16	-64.5	Marine	Free-living	Viral Plasmidi al	Temperate	yes	no	Angly <i>et al.</i> 2006
Sludge_M9	4464073.3	166658	270	46.51	6.51	Terrestrial	Free-living	Plasmidi al	Temperate	no	no	Sentchilo <i>et al.</i> 2013
Sludge_V09	4464109.3	325908	335	46.3	7.85	Terrestrial	Free-living	Plasmidi al	Temperate	no	no	Sentchilo <i>et al.</i> 2014
SpongeAb1	4461456.3	56401	259	-22.73	-41.87	Marine	Host-associated	Microbial	Tropical	no	no	Trindade-Silva <i>et al.</i> 2012
SpongeAb2	4461455.3	142408	279	-22.73	-41.87	Marine	Host-associated	Microbial	Tropical	no	no	Trindade-Silva <i>et al.</i> 2012
TampaBay	4440102.3	257075	105	37.62	-122.07	Marine	Free-living	Viral	Temperate	yes	no	McDaniel <i>et al.</i> 2008
TermiteGut	4442701.3	57641	1067	10.11	-83.51	Terrestrial	Host-associated	Microbial	Tropical	no	yes	Warnecke <i>et al.</i> 2007
Waseca	4441091.3	138347	1116	43.96	93.66	Terrestrial	Free-living	Microbial	Temperate	no	yes	Tringe <i>et al.</i> 2005
WaterJF1	4453374.3	85742	435	-22.73	-41.87	Marine	Free-living	Microbial	Tropical	no	no	Trindade-Silva <i>et al.</i> 2012